

18693

T. C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

PENİSİLİNE DİRENÇLİ ESCHERİCHİA COLİ,  
KLEBSİELLA PNEUMONİAE VE PSEUDOMONAS AERUGİNOSA  
KÖKENLERİNDE BETA - LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. TİJEN ÖZACAR  
İZMİR - 1990

Uzmanlık tezi olarak hazırladığım bu çalışmada büyük katkı ve yardımlarını gördüğüm hocam, Sayın Prof. Dr.Kemal YÜCE ile eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum hocalarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Dr. T.ÖZACAR

## İ Ç İ N D E K İ L E R

I. Giriş	1
II. Genel Bilgiler	4
III. Gereç ve Yöntem	15
IV. Bulgular	20
V. Tartışma	28
VI. Özet	34
VII. Kaynaklar	35

## G İ R İ Ő

Antibiyotiklerin tıpta kullanım alanına girmesinden sonra bakterilerde görülen direnç gelişimi, daima yeni antimikrobiklerin geliştirilmesini gerektiren bir sorun olmuştur (1,37).

Antibiyotiklere karşı direnç ilk defa 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından *Escherichia coli*'de penisilini yıkan bir enzimin varlığının gösterilmesi ile ortaya konmuştur. Daha sonra Kirby, 1944 yılında stafilokokların penisilini yıkan bir ekstraktı olduğunu gösterdi (37). 1950'li yıllarda, Japonya'da bir *Shigella* kökeninde streptomisin, tetrasiklin ve sulfonamidlere direncin gösterilmesi ile çoklu direnç olayı gündeme geldi. Bundan sonra, direnç olayının kromozom dışı vektörler aracılığı ile bir bakteriden diğerine aktarılabilirdiği gösterildi (28). İlk defa *Escherichia coli*'de gösterilen, penisilinlere direnci sağlayan TEM-1 beta-laktamazının, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden sonra 1974 yılında *Haemophilus influenzae*'-da (57), 1976 yılında *Neisseria gonorrhoeae*'de ve 1983 yılında *Neisseria meningitidis*'de (16) gösterilmesi bunun açık bir örneğini vermektedir.

Antibiyotiklerin dünya üzerinde yaygın olarak kullanımını da, duyarlı bakterilerin eliminasyonu ile dirençli bakterilerin prevalansını arttırmaktadır (34). Antibiyotik

çağından önce hastane infeksiyonu etkeni olarak en sık beta-hemolitik streptokoklar görülmekte iken, bugün Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae ve Pseudomonas aeruginosa gibi dirençli bakteriler etken olmaktadır (29,52). Ağır hastalığı olan, invaziv girişimler uygulanan, immün yanıtı zayıf hastalarda bu dirençli bakterilerle oluşan infeksiyonlar büyük bir risk oluşturmaktadır. Uygun antibiyotik tedavisinin hayat kurtarıcı olduğu böyle hastalarda, etkenin duyarlı olduğu antibiyotiği seçebilmek her zaman sorun olmaktadır (1).

Beta-laktam grubu antibiyotikler aşırı duyarlılık reaksiyonları dışında önemli bir yan etkilerinin olmaması nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antimikrobiale ajanlardır (1). Fakat bu grup antibiyotiklere karşı gelişen direnç uygulamada önemli bir sorun oluşturmaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişiminde başlıca üç mekanizma rol oynamaktadır (28,34,37,59).

1. Enzimatik İnaktivasyon: En belirgin olarak beta-laktamazlarla gözlenmektedir. Acyclase, esteraze ve dehydropeptidase gibi enzimler de daha düşük düzeyde ve daha zayıf inaktivasyona neden olmaktadır (50).

2. Hedef Enzimde Değişiklik: Beta-laktam grubu antibiyotiklerin bakteriye etki edebilmesi için stoplazmik membran üzerinde yer alan ve bakteride peptidoglikan sentezini yöneten enzimler olan Penisilin Bağlayan Protein (PBP)'le-

re bağlanması gerekmektedir. Bu enzimlerin afinitesinde olan değişiklik antibiyotik molekülünün bağlanmasını önleyerek dirençe neden olmaktadır. *Staphylococcus aureus*'da görülen metisilin direnci bu mekanizma ile oluşmaktadır.

3. Hücre Duvarından Antibiyotik Molekülünün Geçişinin Önlenmesi: Bakteri hücre duvarındaki porus yapılarının sayısındaki azalma antibiyotik molekülünün hücre içerisine girmesini ve PBP'lere bağlanmasını engeller. Bu mekanizma, Gram olumsuz bakterilerde penisilinaza dirençli penisilinlere karşı gelişen dirençte etkindir (1).

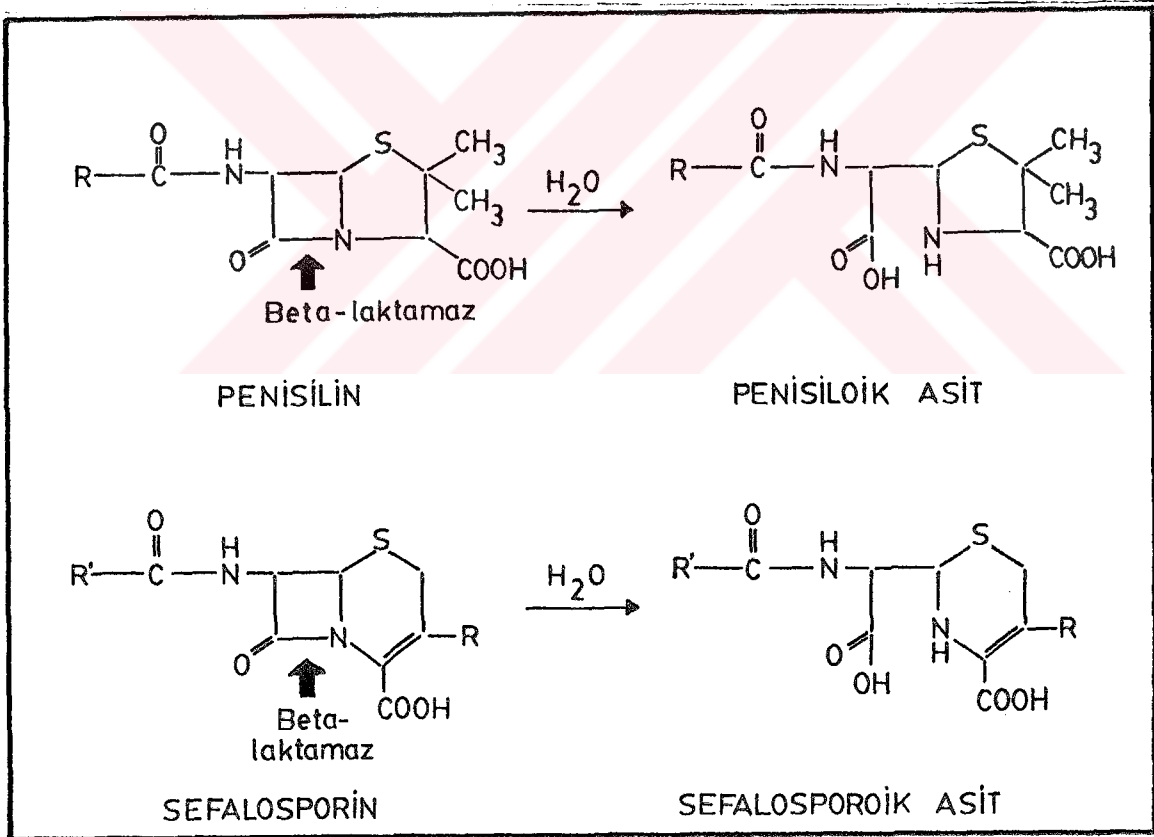
Bu üç direnç mekanizmasından en sık görüleni beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotik molekülünün inaktivasyonu-  
dur (2).

Bu çalışmada, hastanemizde çeşitli örneklerden soyutlanan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde beta-laktamaz aktivitesi araştırılmış ve bölgemizdeki sıklığı hakkında fikir edinilmeye çalışılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### BETA - LAKTAMAZLAR

**Tanımı:** Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağınyı hidrolize ederek beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktive eden enzimlerdir. Bu hidrolizasyon ile penisilinler penisiloik aside, sefalosporinler sefalosporoik aside parçalanırlar. Oluşan bu ürünlerin antimikrobik aktiviteleri yoktur (2,24,28,34,39,59) (Şekil 1).



Şekil 1: Penisilin ve sefalosporin moleküllerinin beta-laktamazlar ile hidrolizasyonu (Kaynak 37'den alınmıştır).

Sentezlenmesi: Beta laktamazların sentezlenmesi kromozomal genler veya plasmidler aracılığıyla, bakteri ribozomlarında olmaktadır (38).

Kromozomal enzimler; hemen hemen tüm bakterilerde bulunmakla birlikte genellikle az miktarda sentezlenirler (34). Bazı bakteriler ise yapısal olarak fazla miktarlarda kromozomal beta-laktamaz üretebilmektedirler (39). Kromozomal beta-laktamazların diğer büyük çoğunluğunun sentezi, indüklenbilir özellik göstermektedir. Bazı beta-laktam bileşikleri ve hücre duvar komponentlerinin etkisiyle enzim sentezi üzerindeki baskılayıcı gen etkisi kalkmakta ve oluşan beta-laktamaz miktarı normalin 500 katına ulaşabilmektedir (37, 49).

Plasmid aracılıklı beta-laktamazlar tüm Gram olumsuz bakterilerde yapısal olarak sentezlenirler. *Staphylococcus aureus*'da ise indüklenbilir özelliktedirler (2). Plasmid aracılığıyla sentezlenen enzim miktarı kromozomal enzimlerden daha fazladır. Ancak sentezlenen enzim miktarı plasmide bağımlı değildir. Genetik çalışmalar ile bakterilerde, bu enzimlerin sentezini düzenleyen üç regülatör gen gösterilmiştir (39).

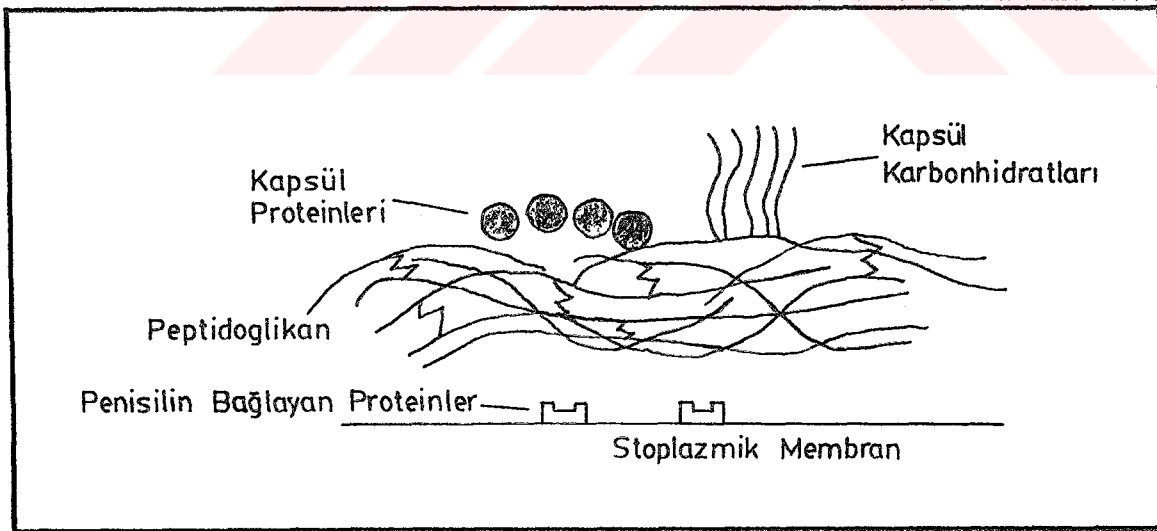
Bakterilerdeki Lokalizasyonu: Beta-laktamazlar sentezlendikten sonra stoplazmik membrana çeşitli derecelerde bağlı olarak bulunurlar. Bu bağlanma derecesi enzimin salınma aktivitesini etkiler (1). Gram olumlu bakterilerde bağ-



lanma çok zayıftır. Bu nedenle sentezlendikten hemen sonra dış ortama salgılanırlar, yani bir ekzoenzim yapısındadırlar (39). Gram olumsuz bakterilerde ise beta-laktamazlar periplazmik aralıkta lokalize olmuşlardır (14).

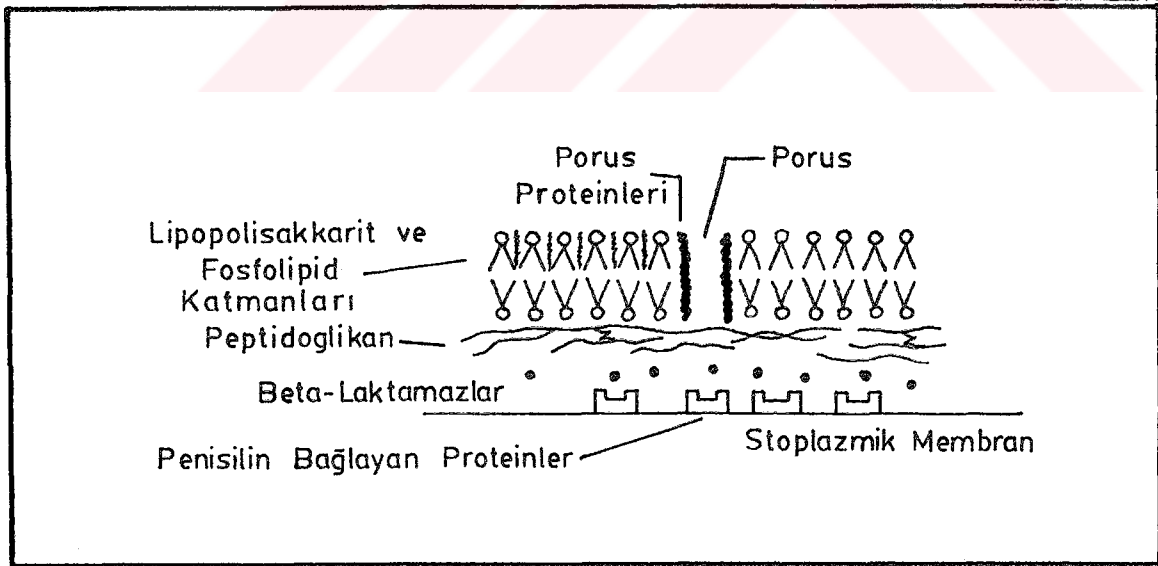
Gram olumlu ve olumsuz bakterilerde, hücre duvarı yapısının ve beta-laktamaz lokalizasyonlarının farklı olması; beta-laktam grubu antibiyotiklerle olan ilişkilerinde de farklılığa yol açmaktadır (39).

Gram olumlu bakterilerde hücre duvarı esas olarak kalın bir peptidoglikan katmanından oluşmuştur, bir dış membran içermez. Bu nedenle eğer dış ortamda bakteri tarafından salgılanmış beta-laktamazlar yok ise antibiyotik molekülü, peptidoglikan katmanını kolaylıkla geçerek PBP'lere ulaşabilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2: Gram olumlu bakterilerde hücre duvarı yapısı (Kaynak 38'den alınmıştır).

Gram olumsuz bakterilerde ise peptidoglikan katmanı incedir; dış kısmında lipopolisakkarit ve fosfolipidlerden oluşmuş bir dış membran vardır. Bu dış membran üzerinde "porus" adı verilen kanal yapıları bulunur. Dış membran, hidrofobik bir bariyer oluşturarak bakteriyi beta-laktam antibiyotiklerden korur ve ancak çok az bir kısmının porus'larından içeriye girmesine izin verir. İçeriye giren antibiyotik molekülleri ise PBP'lere ulaşmadan periplazmik aralıktaki beta-laktamazlarca inaktive edilir (38,39). Bu durumda antibiyotik periplazmik aralığa difüzyon hızı ve bakteri tarafından oluşturulan beta-laktamaz miktarı inhibisyonun derecesini belirlemektedir (33). Şekil 3, Gram olumsuz bakterilerde hücre duvarı yapısını ve beta-laktamazların lokalizasyonunu göstermektedir.



Şekil 3: Gram olumsuz bakterilerde hücre duvarı yapısı (Kaynak 38'den alınmıştır).

Beta-Laktamazların Sınıflandırılması: Beta-laktamazlar substrat ve inhibitör profillerine, izoelektrik noktalarına, molekül ağırlıklarına, genetik özelliklerine ve aminoasit sekanslarına göre çeşitli şekillerde sınıflanmışlardır (28,38,56).

1973 yılında Richmond ve Sykes tarafından yapılan sınıflamada; substrat ve inhibitör profillerine, izoelektrik noktalarına ve molekül ağırlıklarına göre 5 sınıf beta-laktamaz tanımlanmıştır (28,37,39,56).

1976 yılında Sykes ve Matthew bu sınıflamada genetik orijini de göz önüne alarak bir modifikasyon yapmışlardır. Buna göre kromozomal ve plasmid aracılıklı beta-laktamazlar olmak üzere iki ana sınıf oluşmakta, her sınıf ise kendi içerisinde substrat profillerine göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır (28,50,56).

1980 yılında Ambler tarafından yapılan, 1981'de Jaurin ve Grundström tarafından geliştirilen bir başka sınıflamada beta-laktamazlar, aktif bölgelerinin aminoasit sekanslarına göre üç sınıfa ayrılmışlardır (38,56).

Tablo 1 bu sınıflamaları birarada göstermektedir.

Tablo 1: Beta - Laktamazların Sınıflandırılması (K. 56'dan alınmıştır).

Richmond ve Sykes (1973)	Sykes ve Matthew (1976)	Ambler (1980)	Jaurin ve Grundström (1981)
<p>Sınıf I:</p> <p>a. İndüklebilir sefalosporinazlar; Enterobacter, Pseudomonas, Serratia, indololumlu Proteus</p> <p>b. Yapısal sefalosporinazlar E.coli</p>	<p>Sınıf A: Kromozom aracılıklı olanlar</p> <p>a. Penisilinazlar; Nadir görülür</p> <p>b. Sefalosporinazlar; E.coli, Enterobacter, Citrobacter, Pseudomonas, Providencia, indololumlu proteus, B.fragilis, Acinetobacter, Yersinia</p> <p>c. Geniş spektrumlu beta-laktamazlar; Klebsiella</p> <p>Sınıf B: Plasmid aracılıklı olanlar</p> <p>a. Isoxazolyl'i hidrolize etmeyenler; TEM, SHV-tipi enzimler</p> <p>b. Isoxazolyl'i hidrolize edenler; OXA-tipi enzimler</p> <p>c. Diğerleri</p>	<p>Sınıf A:</p> <p>S.aureus, B.cereus I, B.licheniformis, TEM, OXA-2, Streptomyces, Klebsiella</p>	<p>Sınıf B: Metalloenzimler B.cereus II</p>
<p>Sınıf II:</p> <p>Penisilinazlar Nadir görülür</p>			
<p>Sınıf III:</p> <p>Geniş spektrumlu beta laktamazlar; pCMB<sup>r</sup>, clox<sup>d</sup> TEM-1, TEM-2</p>			
<p>Sınıf IV:</p> <p>Geniş spektrumlu beta laktamazlar; pCMB<sup>d</sup>, clox<sup>r</sup> Klebsiella</p>			
<p>Sınıf V:</p> <p>Penisilinazlar, pCMB<sup>r</sup>, clox<sup>r</sup> OXA ve CARB tipi enzimler</p>			<p>Sınıf C:</p> <p>E.coli, Pseudomonas, Enterobacter, Citrobacter, Serratia</p>

pCMB: p-chloromercuribenzoate c: cloxacillin r: inhibisyona dirençli d: inhibisyona duyarlı.

### Gram Olumsuz Bakterilerde Beta-Laktamazlar:

A.Kromozomal Beta-Laktamazlar: Bu gruptaki enzimlerin çoğu Richmond - Sykes sınıflamasındaki Sınıf I'de yer alırlar.İki gruba ayrılırlar;

1.İndüklenebilir Kromozomal Beta-Laktamazlar:Bu enzimlerin izoelektrik odaklama yöntemi ile cins,tür ve alttürlerine spesifik oldukları gösterilmiştir (31,32).Öncelikle sefalosporinaz aktivitesi gösterirler (56).Enzim sentezi sefoksitin ve imipenem ile yüksek derecede indüklenir (5,30,36). Karbenisilin ve klavulanik asitin de daha zayıf indükleyici etkisi vardır (36,44,49). Tüm *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türlerinde indüklenebilir beta-laktamazlar gösterilmiştir.*Escherichia coli* kökenlerinde ise nadiren görülmektedirler (39).

2.Yapısal Kromozomal Beta-Laktamazlar:*Escherichia coli*,*Shigella* ve *Bacteroides* türlerinde hemen hemen tüm kökenlerde az miktarda sentezlenirler.Öncelikle sefalosporinaz aktivitesine sahiptirler.Klebsiellalarda ise geniş spektrumlu beta-laktamazlar,yapısal olarak sentezlenmektedir (39,56).*Enterobacter* türlerinde ve bazı *Escherichia coli* mutantlarında yapısal kromozomal enzim sentezinin çok artmış olduğu gösterilmiştir (11).

B.Plasmid Aracılıklı Beta-Laktamazlar: İlk defa *Escherichia coli*'de gösterilen TEM beta-laktamazından sonra günümüzde 30'dan fazla plazmid aracılıklı beta-laktamaz

tanımlanmıştır.Dört ana gruba ayrılarak incelenirler (3,33, 34,39,56).

1.TEM Tipi Beta-Laktamazlar: İki gruba ayrılırlar;

1a.Penisilinazlar: TEM-1,TEM-2,SHV-1,HMS-1,TLE-1, LCR-1,ROB-1,OHIO-1,BRO-1 bu grupta yer alır.TEM-1,hemen hemen tüm bakterilerde en sık görülen,dünya üzerinde en sık saptanan beta-laktamazdır.Bir transpozon tarafından kodlanmaktadır.

1b.Geniş Spektrumlu Olanlar: Üçüncü jenerasyon sefalosporinleri de hidrolize edebilirler.TEM-3,4,5,6,7, SHV-2,3 bu gruptadır.SHV-2 en sık Klebsiella pneumoniae kökenlerinde saptanmıştır (10).

2.OXA Tipi Beta-Laktamazlar: Metisilin ve isoxazolyl penisilinleri hidrolize ederler.OXA-1,2,3,4,5,6,7 bu grubu oluşturur.Bu enzimleri kodlayan plasmidin transfer kapasitesi kısıtlıdır.Bu nedenle TEM enzimleri kadar sık görülmemektedirler.Fakat son zamanlarda transpozonlar üzerinde de buldukları gösterilmiş ve daha sık saptanmaya başlamışlardır (39).OXA-1,Escherichia coli'de TEM-1'den sonra en sık saptanan beta-laktamazdır (34).

3.CARB Tipi Beta-Laktamazlar: Karbenisilin,tikarsilin,piperasilin ve sefoperazonu hidrolize ederler.CARB-1 (PSE-4),CARB-2 (PSE-1),CARB-3,CARB-4,PSE-3,AER-1,SAR-1 enzimleri bu grupta yer alır.Sıklıkla Pseudomonas türlerinde gösterilmişlerse de Enterobacteriaceae üyeleri arasında ya-

yılmaktadırlar. CARB-2 *Pseudomonas aeruginosa*'da en sık saptanan beta-laktamazdır (34).

4. Diğerleri: CEP-2, NPS-1 ve *Bacteroides fragilis*'in sefoksitini hidrolize eden enzimi bu gruptadır. Nadir olarak görülürler, sefalosporinaz aktivitesi gösterirler (56).

Beta-Laktamazların Saptanması: Beta-laktamazların saptanması, bir duyarlılık testi olmamasına rağmen birçok bakterinin, özellikle *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*'nin mikrobiyolojik tanımlanmasında önemli bir komponenttir (7,21). Bugün, geliştirilen çeşitli hızlı test yöntemleriyle beta-laktamazların, bakteri kültürlerinde, BOS gibi vücut sıvılarında, bronş sekresyonlarında ve kan kültürü supernatantında gösterilmesi mümkün olmaktadır (18, 48, 50). Bu sayede genellikle 18-24 saatte sonuçlanacak antibiyotik duyarlılık testlerinden çok önce tedavinin yönlendirilmesi mümkün olabilmektedir (7,21,50).

Beta-laktamazların saptanmasında kalitatif ve kantitatif yöntemlerden yararlanılabilir (39).

#### A. Kalitatif Yöntemler;

1. Biyolojik Yöntemler: Çeşitli mikrobiyolojik yöntemler kullanarak antibakteriyel aktivitenin kaybedildiğinin gösterilmesidir. Penisilinler veya sefalosporinler kullanılabilir.

2. Asidometrik Yöntemler: Beta-laktam halkasının



hidrolizi ile oluşan asidik ürünlerin yaptığı pH değişikliğinin gösterilmesi esasına dayanırlar.Sefalosporinlerin hidrolizi ile oluşan sefalosporoik asitin stabil bir molekül olmaması ve bir seri yıkım reaksiyonuna girmesi nedeniyle,sefalosporinler bu test için uygun bir substrat değildir (50).Penisilinlerin hidrolizi ile eşdeğer miktarda penisiloik asit oluşmakta ve fenol kırmızısı veya bromkrezol moru indikatör olarak kullanılarak pH düşmesi gösterilmektedir (46,47,54).

3.İodometrik Yöntemler: Penisilinlerin hidrolizi ile oluşan bileşimin iodini redüksiyonu esasına dayanırlar.Koyu mavi-mor renkteki nişasta-iodin çözeltisi,iodinin iodide indirgenmesi ile rengini yitirir (22,23,40,43).

4.Ultravirole Işınları Altında Spektrum Değişikliği: Ampisilin ve sefaleksinin hidrolizi ile oluşan son ürünlerin ultravirole lambası altında fluoresans vermesi en çok kullanılan testlerdendir.Ayrıca bu test ile antibiyotik molekülünün,acyclase'lar ile olan inaktivasyonu,beta-laktamaz hidrolizasyonundan ayrılabilmektedir (12).

5.Kromojenik Sefalosporin Yöntemi: Kromojenik sefalosporinlerin hidroliziyle molekülde oluşan elektron değişikliği,renk değişikliğine yol açmaktadır.Bu amaçla kullanılan nitrocefın sarı renkten kırmızıya,PADAC ise mor renkten sarıya dönüşmektedir (25,35,41).Kromojenik sefalosporin yöntemi ile anaerob bakterilerde de beta-laktamazlar gösterile-



bilmektedir (8).

Gram olumlu bakterilerde beta-laktamazlar ekstrasellüler oldukları için bu yöntemlerden biri ile saptanabilirler. Gram olumsuz enterik bakterilerde ise uygun yöntemlerin seçilmesi gerekir (39). Enterobacter ve Pseudomonas türlerinde ise ek olarak indüklenme testlerine de gerek duyulabilir (49,55).

B. Kantitatif Yöntemler: Çeşitli fiziksel ve biyokimyasal yöntemlerle hidrolize edilen substrat miktarının veya hidroliz sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesidir. İodometrik yöntem, asidometrik yöntem, manometrik yöntem, spektrofotometrik yöntem veya kromojenik sefalosporin yöntemleri uygulanabilir (12,39,41,45).

Beta-laktamaz aktivitesinin kantitatif ifadesi için sabit bir ünite tarif edilmiştir. Buna göre; bir beta-laktamaz ünitesi, bir molekül benzil penisilini 30°C ve 7.0 pH'da, bir saatte hidrolize eden enzim miktarıdır. Beta-laktamaz testlerinde reaksiyonun standart olarak bu koşullar altında yapılamaması nedeniyle aktivitenin ünite olarak belirlenmesi her zaman mümkün olamamaktadır (39).

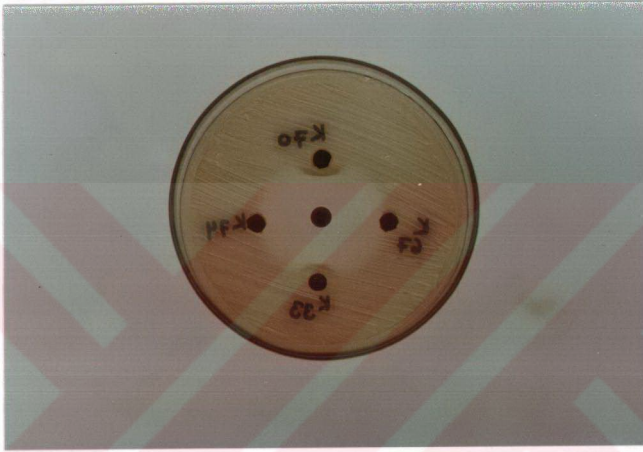
## G E R E Ç v e Y Ö N T E M

Çalışmada çeşitli örneklerden soyutlanan, penisiline dirençli 100 Escherichia coli, 80 Klebsiella pneumoniae ve 120 Pseudomonas aeruginosa kökeni incelendi. Bakterilerin penisiline karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi (50).

Beta-Laktamaz Aktivitesinin Saptanması: Tüm kökenlerde üç ayrı yöntemle çalışıldı.

1.Çift Disk Yöntemi: Ampisiline duyarlı, inhibisyon zon çapı 37 mm. olan Staphylococcus aureus kökeninin ve test edilecek kökenlerin beyin-kalp infüzyon sıvısında 18 saatlik kültürleri yapıldı. 70 mm. çaptaki petri plaklarına dökülmüş beyin-kalp infüzyon agar yüzeyine indikatör köken olan Staphylococcus aureus kültüründen silgiç yardımı ile yüzey ekimi yapıldı. Bir süre etüvde bekletilerek yüzeyi kurutuldu. Plağın ortasına 10 µgr. ampisilin içeren antibiyotik diski yerleştirildi. Daha önceden filtre kağıdından 6,5 mm. çapta kesilerek, sterilize edilen kağıt diskler test edilecek bakteri kültürüne daldırıldı, fazla sıvı tüp kenarında sızdırıldıktan sonra ampisilin diskin- den 20 mm. uzakta olacak şekilde plağa yerleştirildi. Her plağa 4 ayrı, bakteri içeren kağıt diskler, ampisilin diski etrafına 4 yönde yerleştirildi. Plaklar 37°C'lık etüvde

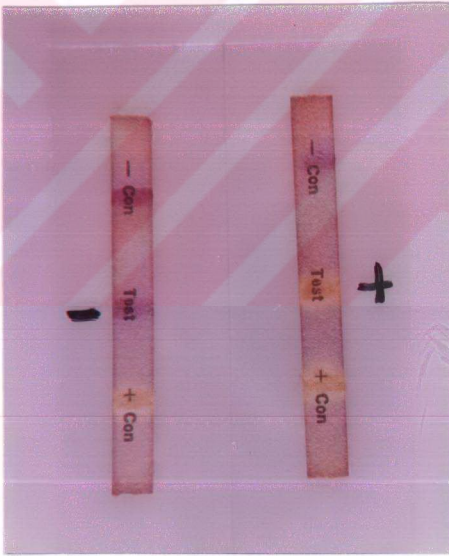
48 saat inkübe edildi.İnkübasyon sonrası beta-laktamaz salgılayan bakterilerin bulunduğu diskin çevresinde indikatör kökenin ürediği ve inhibisyon zonunun daraldığı gözlemlendi (20,26,39)(Resim 1).



Resim 1: Çift disk yöntemi. Altta ve üstte beta-laktamaz salgılayan, sağda ve solda beta-laktamaz salgılamayan kökenler.

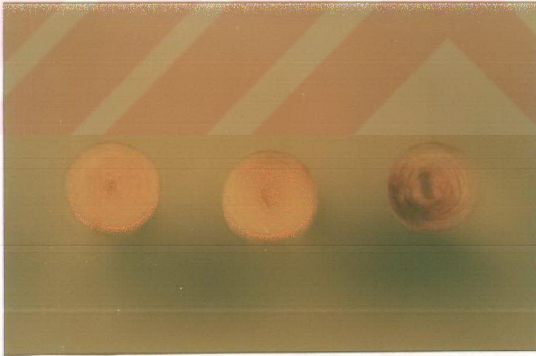
2. Asidometrik Yöntem (İntralaktam): Uygun konsantrasyonlarda benzil penisilin ve bromkrezol moru emdirilmiş kağıt şeritler (Mast Diagnostics Limited, Merseyside, UK) temiz bir lam üzerine konarak pH 7.0 olan distile su ile nemlendirildi. Test bakterisinin kanlı jeloz besiyerindeki 18-24 saatlik kültüründen öze ile 3-4 koloni alınarak kağıt şerit üzerine sürüldü. Pozitif kontrol olarak daha önceden beta-laktamaz salgıladığını diğer testler ile saptan-

duğumuz bir stok köken, negatif kontrol olarak da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kökeni her şerit üzerinde ayrı bölgelere sürüldü. Olumlu sonuçlar 10 dakika içinde test bakterisinin sürüldüğü yerde oluşan mor rengin, sarıya dönüşmesi ile değerlendirildi. Olumsuz kökenlerde lamalar, içine ıslak filtre kağıdı konmuş petri kutularında, 37°C'lik etüve konarak 20 dakika daha izlendi. Kağıdın renginin yine mor olarak kalması olumsuz olarak değerlendirildi (46, 50) (Resim 2).



Resim 2: İntralaktam yöntemi. Sağda beta-laktamaz salgılayan (sarı), solda ise salgılamayan (mor) kökenler.

3.Kromojenik Sefalosporin Yöntemi (Nitrocefın): Bir ucuna nitrocefın emdirilmiş kağıt çubuklar (Oxoid Limited, Basingstoke,Hampshire,UK),işaretili ucundan tutularak,test bakterisinin kanlı jeloz üzerindeki 18-24 saatlik kolonisine değdirildi.Hafif bir rotasyon hareketi ile çubuk ucuna bir miktar bakteri alındı.Çubuklar ters çevrilmiş petri kapaklarındaki kondansasyon sıvısı ile,bu yeterli değilse bir iki damla distile su ile nemlendirildi.Olumlu sonuçlar 5 dakika içinde çubuğun ucundaki sarı rengin koyu pembe-kırmızıya değışmesi ile değerlendirildi.Renk değışimi olmayan çubuklar 15 dakika daha izlendi,kullanılmamış çubuklar ile karşılaştırılarak değerlendirildi (35,39,41,50) (Resim 3).



Resim 3: Nitrocefın çubuk yöntemi.Solda kullanılmamış çubuk, ortada beta-laktamaz salgılamayan,sağda ise salgılayan (kırmızı) kökenler.

İstatistiksel İnceleme: Uygulanan beta-laktamaz testleri arasındaki duyarlılık farkı, Ege Üniversitesi Bilgisayar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılan  $\chi^2$  (Chi square) analizi ile araştırıldı.



## B U L G U L A R

Beta-laktamaz salgılarını araştırdığımız 100 *Escherichia coli*, 80 *Klebsiella pneumoniae* ve 120 *Pseudomonas aeruginosa* kökeninin elde edildiği örneklerin dağılımı ve üç ayrı testle verdikleri sonuçlar Tablo 2, 3 ve 4'te görölmektedir.

*Escherichia coli* kökenlerinin 88'i (% 88) idrardan, 8'i (% 8) sürüntü örneklerinden, diğerleri çeşitli örneklerden elde edilmiş olup, 63 kökende (% 63) beta-laktamaz aktivitesi en az bir yöntemle gösterilmiştir. 37 kökende (% 37) ise her üç yöntemle de beta-laktamaz aktivitesi saptanamamıştır (Tablo 2).

*Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin 35'i (% 43,8) idrardan, 16'sı (% 20) sürüntü örneklerinden, diğerleri çeşitli örneklerden elde edilmiştir. Toplam 80 kökenden 58'inde (% 72,5) beta-laktamaz aktivitesi en az bir yöntemle gösterilmiş, 22'sinde (% 27,5) ise saptanamamıştır (Tablo 3).

*Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin 49'u (% 40,8) idrardan, 20'si (% 16,6) sürüntü örneklerinden, 15'i (% 12,5) kulak akıntısından, 15'i (% 12,5) transtrakeal aspirasyon sıvısı ve balgam örneklerinden elde edilmiştir. Toplam 120 kökenden 80'inde (% 66,7) beta-laktamaz aktivitesi saptanmış, 40'ında (% 33,3) ise beta-laktamaz varlığı gösterilememiştir (Tablo 4).

Tablo 2: Escherichia coli Kökenlerinin Örneklerle Dağılımı ve Çift Disk, İntralaktam ve Nitrocefin Testleriyle Alınan Sonuçlar

Örnek	n	Üç Yöntemle		ÇD (-)			ÇD (+)		
		Olumsuz	Olumlu	İL (-)	İL (+)	NC (+)	İL (-)	İL (+)	NC (-)
İdrar	88	31	27	25	3	1	1	1	1
Sürüntü	8	5	1	1	1	-	-	-	-
TTA	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Kulak Akıntısı	1	-	-	1	-	-	-	-	-
Batın Sıvısı	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Apse	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOPLAM</b>	<b>100</b>	<b>37</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

ÇD: Çift disk yöntemi İL: İntralaktam yöntemi NC: Nitrocefin çubuk yöntemi  
TTA: Transtrakeal aspirasyon sıvısı



Tablo 3: Klebsiella pneumoniae Kökenlerinin Örneklerle Dağılımı ve Çift Disk, İntralaktam ve Nitrocefin Testleriyle Alınan Sonuçlar

Örnek	n	Üç Yöntemle		Üç Yöntemle			ÇD (-)			ÇD (+)		
		Olumsuz	Olumlu	ÇD (-)	İL (-)	NC (+)	ÇD (-)	İL (+)	NC (+)	ÇD (+)	İL (-)	NC (+)
İdrar	35	7	18	3	6	1	6	1	1	1	1	-
Sürüntü	16	8	6	-	2	-	2	-	-	-	-	-
TTA, Balgam	10	3	5	1	1	-	1	-	-	-	-	-
Boğaz Sürüntüsü	8	2	4	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Kulak Akıntısı	3	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Apse	4	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Kan	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ejakulat	2	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-
TOPLAM	80	22	38	8	10	2	10	2	2	2	2	-

Tablo 4: Pseudomonas aeruginosa Kökenlerinin Örneklerle Dağılımı ve Çift Disk, İntralak-  
tam ve Nitrocefin Testleriyle Alınan Sonuçlar

Örnek	n	Üç Yöntemle		Üç Yöntemle Olumlu			ÇD (-)			ÇD (+)		
		Olumsuz	Olumlu	ÇD (-)	İL (-)	NC (+)	ÇD (-)	İL (+)	NC (+)	ÇD (+)	İL (-)	NC (+)
İdrar	49	11	20	7	3	3	7	7	1			
Sürüntü	20	8	6	3	-	-	3	3	-			
Kulak Akıntısı	15	8	5	-	-	-	2	2	-			
TTA, Balgam	15	5	2	3	-	-	5	5	-			
Boğaz Sürüntüsü	12	4	2	4	-	-	2	2	-			
Apse	6	2	3	1	-	-	-	-	-			
Kan	2	1	-	-	1	1	-	-	-			
Batın Sıvısı	1	1	-	-	-	-	-	-	-			
<b>TOPLAM</b>	<b>120</b>	<b>40</b>	<b>38</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>1</b>			

Tablo 5: İncelenen Kökenlerde Çift Disk, İntralaktam ve Nitrocefin Testleriyle Alınan Sonuçlar ve Yüzdeleri

Bakteri	n	Üç Yöntemle Üç Yöntemle		ÇD (-)		ÇD (+)		ÇD (+)	
		Olumsuz	Olumlu	İL (-)	NC (+)	İL (-)	NC (+)	İL (-)	NC (+)
E.coli	100	37 % 37	30 % 30	27 % 27	4 % 4	1 % 1	1 % 1	1 % 1	1 % 1
K.pneumoniae	80	22 % 27,50	38 % 47,50	8 % 10,00	10 % 12,50	2 % 2,50	2 % 2,50	2 % 2,50	2 % 2,50
P.aeruginosa	120	40 % 33,33	38 % 31,66	18 % 15,00	4 % 3,33	19 % 15,83	1 % 0,83	1 % 0,83	1 % 0,83
TOPLAM	300	99 % 33,00	106 % 35,33	53 % 17,66	18 % 6,00	22 % 7,33	2 % 0,66	2 % 0,66	2 % 0,66

Tablo 5, beta-laktamaz aktivitesini incelediğimiz üç grup bakteriyle alınan sonuçları toplu olarak göstermektedir. Buna göre incelediğimiz 100 *Escherichia coli* kökeninin 63'ünde (% 63), 80 *Klebsiella pneumoniae* kökeninin 52'sinde (% 72,5), 120 *Pseudomonas aeruginosa* kökeninin ise 80'inde (% 66,7) beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır. Tüm incelenen kökenler içinde beta-laktamaz salgılama oranı % 67 olarak bulunmuştur. Bunların % 35,33'ünde her üç yöntemle de aktivite saptanmıştır. % 6'sında intralaktam ve nitrocefın yöntemleri ile, % 7,33'ünde çift disk ve nitrocefın yöntemleri ile, % 0,66'sında çift disk ve intralaktam yöntemleri ile beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır. % 17,66'sında ise yalnızca nitrocefın yöntemi beta-laktamaz aktivitesini göstermiştir.

Uygulanan yöntemlerin duyarlılığını belirlemek amacıyla, bu sonuçlar  $X^2$  analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Çift disk ve intralaktam yöntemleri arasındaki duyarlılık farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p < 0,05$ ). Çift disk ve intralaktam yöntemleri ile nitrocefın yöntemi arasındaki farkların ise anlamlı olduğu görüldü ( $p \geq 0,05$ ). Nitrocefın testi daha duyarlı bulundu.

İncelediğimiz kökenler elde edildikleri örnekler açısından gruplanacak olursa, idrar ve sürüntü örnekleri sayısal olarak anlamlı gruplar oluşturmaktadır. Tablo 6 ve 7

bu örneklerden soyutlanan kökenlerde belirlenen beta-laktamaz aktivitelerini göstermektedir.

Tablo 6: İdrar Örneklerinden Soyutlanan Kökenlerde Beta-Laktamaz Aktivitesi

Bakteri	n	Beta-Laktamaz Salgılayan		Beta-Laktamaz Salgılamayan	
		n	%	n	%
E.coli	88	57	64,8	31	35,2
K.pneumoniae	35	28	80,0	7	20,0
P.aeruginosa	49	38	77,6	11	22,4
TOPLAM	172	123	71,5	49	28,5

Tablo 6'da görüldüğü üzere, idrar örneklerinden soyutlanan 172 kökenin 88'i Escherichia coli, 35'i Klebsiella pneumoniae ve 49'u Pseudomonas aeruginosa'dır. E.coli'lerin 57'sinde (% 64,8), K.pneumoniae'ların 28'inde (% 80,0) ve P.aeruginosa'ların 38'inde (% 77,6) beta-laktamaz aktivitesi olumlu bulunmuştur. Tüm bakteriler içinde beta-laktamaz salgılayanların oranı % 71,5'tir.

Tablo 7: Sürüntü Örneklerinden Soyutlanan Kökenlerde Beta-Laktamaz Aktivitesi

Bakteri	n	Beta-Laktamaz Salgılayan		Beta-Laktamaz Salgılamayan	
		n	%	n	%
E.coli	8	3	37,5	5	62,5
K.pneumoniae	16	8	50,0	8	50,0
P.aeruginosa	20	12	60,0	8	40,0
TOPLAM	44	23	52,3	21	47,7

Tablo 7'de görüldüğü üzere, sürüntü örneklerinden soyutlanan 44 kökenin 8'i *Escherichia coli*, 16'sı *Klebsiella pneumoniae* ve 20'si *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *E.coli*'lerin 3'ünde (% 37,5), *K.pneumoniae*'ların 8'inde (% 50,0) ve *P.aeruginosa*'ların 12'sinde (% 60,0) beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır.Sürüntü örneklerinden soyutlanan toplam 44 kökende,beta-laktamaz aktivitesi % 52,3 oranında bulunmuştur.

## T A R T I Ő M A

Gram olumsuz bakterilerle oluşan, 6zellikle hastanelerde gelişen infeksiyonlarda etkenlerin bir6ok antibiyotiğe diren6li olması bilinen bir ger6ektir. Bu diren6, bir6ok yeni antibiyotiğin kullanım alanına girmesine karŐın her ge6en g6n artıŐ g6stererek b6y6k bir sorun oluŐurmaktadır.

ABD'nde 1973 yılında *Escherichia coli*'de % 23 oranında ampisilin direnci g6r6l6yor iken, 1983'te bu oranın % 31'e y6kseldiği belirlenmiŐtir. Yine aynı 10 yıllık d6nemde *Klebsiella pneumoniae* k6kenlerinde ampisilin direncinin % 92'den, % 96'ya ulaŐtıĐı; *Pseudomonas aeruginosa* k6kenlerinde ise % 99 olan diren6lilik oranında bir deĐiŐme olmadığı g6r6lm6Őtir (6).

B6lgemizde de bu 66 bakterinin antibiyotik duyarlılıklarını saptamaya y6nelik 6alıŐmalar yapılmıŐtır. 1987'de Tokbaş ve ark. 6eŐitli 6rneklerden soyutlanan 198 *E. coli* k6keninin % 93,4 ve 51 *K. pneumoniae* k6keninin % 100 oranında ampisiline diren6li olduğunu saptamışlardır (53). Yine 1987 yılında Y6ce ve ark. idrar ve dıŐkı 6rneklerinden soyutladıkları 100 *E. coli* k6keninde ampisiline % 60 oranında diren6 olduğunu bildirmişlerdir (58). 1988 yılında Coşar, idrar yolu infeksiyonuna neden olan 130 *E. coli* k6keninde % 71 oranında ampisilin direnci saptamıŐtır (13). İzmir'-

de yapılan bir başka çalışmada Çelikdemir ve ark., 1985 - 1987 yılları arasında soyutladıkları 149 *P.aeruginosa* kökeninde % 98 oranında ampisilin direnci bulmuşlardır (15).

Görüldüğü gibi İzmir bölgesinde bu üç bakteride ampisiline karşı yüksek oranda direnç mevcuttur. Bizim çalışmamızda bu direncin hangi oranda beta-laktamaz salgılanmasına bağlı olduğu belirlenmeye çalışılmıştır.

Medeiros ve ark. 1984 yılında Fransa'da *E.coli* kökenlerinde % 25 oranında beta-laktamazlara bağlı ampisilin direnci saptamışlardır (3). 1987'de O'Brien ve ark. toplumdaki edinilmiş infeksiyonlarda etken olan *E.coli* kökenlerinde % 15 - 30, hastane infeksiyonlarında etken olan kökenlerde ise % 40 - 60 oranında beta-laktamaz aktivitesi bulduklarını bildirmişlerdir (4). Bizim çalışmamızda *E.coli* kökenlerinde % 63 oranında beta-laktamaz aktivitesi saptandı. Beta-laktamaz aktivitesi saptanamayan kökenlerde ampisilin direncinin , penisilin bağlayan proteinlerin afinitesindeki ya da bakteri dış membranının geçirgenliğindeki değişikliğe bağlı olabileceği düşünüldü.

Ampisilinin beta-laktamaz inhibitörü ile kombinasyonu sonucunda *E.coli* kökenlerinde görülen duyarlılık artışı, Tokbaş ve ark. tarafından % 62,0 , Yüce ve ark. tarafından % 41 olarak bildirilmiştir (52,57). Bu bulgular da *E.coli*'deki ampisilin direncinin, büyük oranda beta-laktamaz kaynaklı olduğunu dolaylı olarak göstermektedir.



Danimarka'da Togsverd ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, idrar yolu infeksiyonu etkeni olan ampisiline dirençli 75 E.coli kökeni incelenmiş ve % 98,7 oranında beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca bu beta-laktamazların % 90,7 oranında TEM-1 enzimi içerdiği bildirilmiştir (51). Ankara'da Kocabeyoğlu ve ark., idrar örneklerinden soyutladıkları 200 E.coli kökeninde asidometrik yöntemle beta-laktamaz aktivitesini araştırmışlar ve % 25 oranında olumlu bulmuşlardır (27). Bizim çalışmamızda ise, idrar örneklerinden soyutlanan 88 E.coli kökeninin % 64,8'inde beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır.

1986 yılında Brook ve ark., apse örneklerinden soyutladıkları 14 E.coli kökeninde % 78,6 oranında beta-laktamaz aktivitesi bildirmişlerdir (9). Bizim çalışmamızda apse örneğinden soyutlanmış sadece bir E.coli kökeni mevcuttur ve beta-laktamaz aktivitesi göstermiştir.

O'Brien ve ark. 1984'te hastane infeksiyonlarında etken olan K.pneumoniae kökenlerinde % 100 oranında beta-laktamaz aktivitesi bildirmişlerdir (4). K.pneumoniae kökenlerinde yapılan çalışmalarda; Fransa'da % 35 - 50, Senegal'de % 74,4 ve Dakar'da % 74,6 oranında beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır (42). Bizim incelediğimiz 80 K.pneumoniae kökeninde % 72,5 oranında beta-laktamaz aktivitesi bulunmuştur. Bu oran Senegal ve Dakar'daki oranlarla uyumluluk göstermektedir.

İncelediğimiz 120 *P.aeruginosa* kökeninde % 66,7 oranında beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır. O'Brien ve ark. hastane infeksiyonlarında etken olan *P.aeruginosa* kökenlerinde % 100 oranında beta-laktamaz aktivitesi bildirmişlerdir (4). Bu konuda ülkemizde yapılan bir çalışmada Erdemoğlu ve ark., Ankara'da 1988-89 yıllarında çeşitli örneklerden soyutladıkları *P.aeruginosa* kökenlerinde katı besiyerinde nişasta-iodin yöntemi ile beta-laktamaz aktivitesini araştırmışlardır. 1988 yılında soyutlanan 91 kökenin % 79,1'inde, 1989 yılında soyutlanan 133 kökenin % 83,1'inde aktivite saptamışlardır (19). Bu oran bizim saptadığımız orandan daha yüksektir.

*Pseudomonas* türlerinde sıklıkla indüklenabilir beta-laktamazlar olduğu gösterilmiştir. Özellikle imipenem ve sefoksitin beta-laktamaz salgılanmasını uyarmaktadır (5). Bu nedenle *P.aeruginosa* kökenlerinde beta-laktamaz aktivitesinin indüksiyon testleriyle değerlendirilmesi daha yüksek oranlar verecektir (49,55). Ayrıca *P.aeruginosa* kökenlerinde antibiyotik direncindeki önemli bir mekanizma da hücre duvar geçirgenliğindeki azalmadır. Yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* dış membranının *E.coli*'den 20 kat, *Enterobacter cloacae*'den 100 kat daha az geçirgen olduğu gösterilmiştir (44). Bu nedenle antibiyotik molekülünün hücre içine penetrasyonu daha güç olmakta, bu da direnci arttırmaktadır.

Yukarıda verilen oranlarda görüldüğü gibi her bakteri

türü için çeşitli ülkelerden bildirilen beta-laktamaz aktiviteleri büyük farklılıklar göstermektedir. Bu sonuçlar o bölgede antibiyotik kullanım sıklığı ve plasmid aracılıklı beta-laktamazların yaygınlığına bağlıdır. Bugün daha ileri olanaklara sahip laboratuvarlarda, bakterilerdeki beta-laktamazların tipleri belirlenmekte ve sıklığı araştırılmaktadır. Örneğin 1984'te Medeiros ve ark.'nın yaptığı çok merkezli bir çalışmada E.coli kökenlerinde görülen beta-laktamaz tipleri araştırılmıştır. Buna göre TEM-1 enzimi Güney Afrika'da % 49, Paris ve Brezilya'da % 76, Endonezya'da % 82, Bangkok'ta % 93 oranında saptanmıştır. Bunun yanında OXA-1 enzimi Brezilya ve Güney Afrika'da % 11 oranında görülürken, Paris ve Bangkok'ta saptanamamıştır (4). Simpson ve ark. 1980 yılında E.coli kökenlerinde % 62 - 69 oranında TEM tipi beta-laktamazlar saptamışlar, 1986'da yaptıkları çalışmada ise bu oranın % 81'e ulaştığını görmüşlerdir (56).

Çalışmamızda beta-laktamaz salgılayan 201 kökenden 199'unda olumlu sonuç veren nitrocefin çubuk testi, yapılan  $X^2$  analizi ile intralaktam ve çift disk yöntemlerinden daha duyarlı bulunmuştur. Çift disk ve intralaktam yöntemleri ile beta-laktamaz salgıladığı gösterilen bir E.coli ve bir P.aeruginosa kökeninde nitrocefin çubuk testi olumsuz sonuç vermiştir. Bu kökenlerde öncelikle penisilinaz aktivitesi gösteren beta-laktamazlar olabileceği düşünüldü.

Yapılan istatistiksel analizde 201 beta-laktamaz sal-

gılayan kökemin 130'unda olumlu sonuç veren çift disk yöntemi ile 126'sında olumlu sonuç veren intralaktam yöntemi arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü.

Bu konuda yapılmış çalışmalardan bazılarında şu sonuçlar alınmıştır.1981 yılında Sng ve ark.,Staphylococcus aureus ve Neisseria gonorrhoeae kökenlerinde intralaktam,kromojenik sefalosporin ve hızlı iodometrik yöntemle beta-laktamaz aktivitesini araştırmışlar ve her üç yöntemin % 100 paralel sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (47). 1987'de Doern ve ark. 74 Branhamella catarrhalis kökeninde altı ayrı beta-laktamaz testi ile enzim aktivitesini araştırmışlar,sonuçta tüp ve disk nitrocefın yöntemlerini diğerlerinden daha duyarlı olarak bulmuşlardır.Nitrocefın yöntemlerini sırasıyla PADAC disk testi,asidometrik disk,asidometrik tüp ve iodometrik yöntem izlemiştir (17).

Çalışmamızda kullandığımız beta-laktamaz testlerinden intralaktam ve nitrocefın çubuk yöntemleri uygulaması kolay ve çabuk testler olarak değerlendirildi.Çift disk yönteminde ise sonucun alınması,bakterinin elde edilmesinden ancak iki-üç gün sonra olabilmektedir.Ayrıca uygulanması rutin laboratuvarlar için kolay değildir.Nitrocefın çubuk testinin duyarlılığı da diğer testlerden fazla olarak bulunmuştur.Bu nedenle nitrocefın çubuk testi,rutin laboratuvarlarda uygulanım kolaylığı ve duyarlılığı ile tarama testi olarak kullanılabilir.

## Ö Z E T

Çalışmada; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli örneklerden soyutlanan, penisiline dirençli 100 *Escherichia coli*, 80 *Klebsiella pneumoniae* ve 120 *Pseudomonas aeruginosa* kökeninde beta-laktamaz aktiviteleri çift disk, intralaktam ve nitrocefın çubuk yöntemleri ile araştırıldı.

*Escherichia coli* kökenlerinde % 63, *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde % 72,5 ve *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde % 66,7 oranında beta-laktamaz varlığı saptandı. Enzim aktivitesi saptanamayan kökenlerde penisilin direncinin penisilin bağlayan proteinlerdeki afinite değişikliğine veya bakteri hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasına bağlı olabileceği düşünöldü.

Uygulanan beta-laktamaz testleri içinde nitrocefın çubuk yöntemi, uygulaması kolay ve diğer yöntemlerden daha duyarlı olarak bulundu.

K A Y N A K L A R

1. ACAR JF: Problems and changing patterns of resistance with gram negative bacteria. Rev Infect Dis 1985;7 (Suppl 4):545-51
2. ACAR JF, MINOZZI C: Role of beta-lactamases in the resistance of gram negative bacilli to beta-lactam antibiotics. Rev Infect Dis 1986;8(Suppl 5):482-86
3. ACAR JF, GUTMANN L, KITZIS MD: Beta-lactamases in clinical isolates. spectrum implications of sulbactam/ampicillin. Drugs 1988;35(Suppl 7):12-16
4. ACAR JF, KITZIS MD, GUTMANN L: The incidence of beta-lactamase producing pathogens. APMIS 1989;5:2-8
5. ARONOFF SC, SHLAES DM: Factors that influence the evolution of beta-lactam resistance in beta-lactamases inducible strains of Enterobacter cloacae and Pseudomonas aeruginosa. J Infect Dis 1987;155:936-41
6. ATKINSON BA: Species incidence, trends of susceptibility to antibiotics in the US and other countries: MIC and MBC. Antibiotics in laboratory medicine, 2nd Edition (Ed: LORIAN V) Baltimore: Williams and Wilkins, 1986; 995-1163
7. FINEGOLD SM, BARON EJ: Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 7th Edition, St Louis: The C.V. Mosby Company, 1986; 197-98
8. BOURGAULT AM, ROSENBLATT JE: Characterization of anaerobic gram negative bacilli by using rapid slide tests for beta-lactamase production. J Clin Microbiol 1979;9(6):654-56
9. BROOK I: Presence of beta-lactamase-producing bacteria and beta-lactamase activity in abscesses. Am J Clin



Pathol 1986;86(1):97-101

10. BRUN-BUISSON C, LEGRAND P, PHILIPPON A, MONTRAVERS F, ANSQUER M, DUVAL J: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987;2:302-6
11. BURMAN LG, PARK JT, LINDSTROM EB, BOMAN HG: Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: Identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. *J Bacteriol* 1973;116(1):123-30
12. CHEN KCS, KNAPP JS, HOLMES KK: Rapid, inexpensive method for specific detection of microbial beta-lactamases by detection of fluorescent end products. *J Clin Microbiol* 1984;19(6):818-25
13. COŞAR G: Üropatojen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, hemoliz ve insan O grubu eritrositleri ile hemaglutinasyon özellikleri. *İnfeksi Derg* 1988; 2(1):55-60
14. CURTIS NAC, RICHMOND MH, SYKES RB: "Periplasmic" location of a beta-lactamase specified either by a plasmid or a chromosomal gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1972; 112(3):1433-34
15. ÇELİKDEMİR İ, ÇAKIR N, YÜCE A, BAHAR İH: Hastalardan soyutulan *Staphylococcus* ve *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1988;18(3-4):87-94
16. DILLON JR, PAUZE M, YEUNG KM: Spread of the penicillinase-producing and transfer plasmids from gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983;1:532-5
17. DOERN GV, TUBERT TA: Detection of beta-lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with

- six different beta-lactamase assays. *J Clin Microbiol* 1987;25(8):1380-83
18. DRAGICEVIC P, HILL SL, BURNETT D, MERRIKIN D, STOCKLEY RA: Activities and sources of beta-lactamase in sputum from patients with bronchiectasis. *J Clin Microbiol* 1989;27(5):1055-61
19. ERDEMOĞLU A, GÜN H, BAŞUSTAOĞLU A: Değişik klinik örneklerden izole edilen bakterilerin beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Derg* 1990;4(2):259
20. ERSÖZ S: Penisiline dirençli stafilokoklarda çeşitli yöntemlerle penisilinaz araştırılması. Uzmanlık Tezi, İzmir, 1984
21. GANTZ NM, GIECKMAN RA, BROWN RB, ESPOSITO AL: Manual of clinical problems in infectious disease. 2nd Edition. Boston: Little, Brown and Company, 1986;343-45
22. GUNN BA, KEISER JF, ALMAZAN RD: Culture media, tests and reagents in bacteriology. Clinical and pathogenic microbiology (Ed: HOWARD BJ) St Louis: The C.V. Mosby Company, 1987;853-54
23. HAFIZ S, FAROOQI B, FUNJWANI S, RAJAN S, SARWAR M: A simple inexpensive method for the detection of beta-lactamase in microorganisms. *J PMA* 1987;37:170-71
24. HOEPRICH PD: Antimicrobics and anthelmintics for systemic therapy. Infectious diseases, 4th Edition (Eds: HOEPRICH PD, JORDAN MC) Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1990;235-39
25. HORTON KA, JENNINGS BR, BASELSKI VS: Beta-lactamase testing of staphylococci in a commercial broth microdilution minimum inhibitory concentration system. *J Clin Microbiol* 1982;16:406-7
26. KJELLANDER J, MYRBACK KE, SJUKHuset K: A simple test for penicillinase production. *APMIS* 1964;61:494



27. KOCABEYOĞLU Ö, EMEKDAŞ G, KERSE İ, ÖZYURT M, YÜCEL N, KORU Y: İdrardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarında penisilinaz aktivitesi ve penisilinlere direncin araştırılması. ANKEM Derg 1990;4(2):222
28. LADEN SK, HAMILTON CW, ROMANKIEWICZ JA, ACAR JF: Overview of antimicrobial agent resistance. Beta-lactamase inhibition: pharmacology, antimicrobial activity and pharmacokinetics (Ed:ACAR JF) New Jersey: Advanced Therapeutics Communications Inc, 1985;7-11
29. LARSEN RA: Nosocomial infections. Infectious diseases, 4th Edition (Eds: HOEPRICH PD, JORDAN MC) Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1990;36
30. LIVERMOORE DM, YANG YJ: Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 1987;155:775-82
31. MATTHEW M, HARRIS AM, HARSHALL MJ, ROSS GW: The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975;88:169-78
32. MATTHEW M, HARRIS AM: Identification of beta-lactamases by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy. J Gen Microbiol 1976;94:55-67
33. MATTHEW M, HEDGES RW, SMITH JT: Types of beta-lactamase determined by plasmids in Gram-negative bacteria. J Bacteriol 1979;138(3):657-62
34. MAYER KH, OPAL SM, MADEIROS AA: Mechanisms of antibiotic resistance. Principles and practise of infectious diseases, 3rd Edition (Eds: MANDELL GL, DOUGLAS RG, BENNET JE) New York: John Wiley and Sons Inc, 1990;218-23
35. MONTGOMERY K, RAYMUNDO L, DREW WL: Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. J Clin Microbiol 1979;9(2):205-7

36. MOOSDEEN F, KEEBLE J, WILLIAMS JD: Induction/inhibition of chromosomal beta-lactamases by beta-lactamase inhibitors. *Rev Infect Dis* 1986;8(Suppl 5):562-67
37. NEU HC: Beta-lactamases: a perspective on the contribution of these enzymes to bacterial resistance. *Postgrad Med* 1984;(Sep-Oct Suppl):7-21
38. NEU HC: Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases. *Am J Med* 1985;79(Suppl 5B):2-12
39. NEU HC: Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. *Antibiotics in laboratory medicine*, 2nd Edition (Ed: LORIAN V) Baltimore: Williams and Wilkins, 1986:757-81
40. OBERHOFER TR, TOWLE DW: Evaluation of the rapid penicillinase paper strip test for detection of beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 1982;15(2):196-99
41. O'CALLAGHAN CH, MORRIS A, KIRBY SM, SHINGLER AH: Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972;1(4):283-88
42. PHILIPPON A, REDJEB SB, FOURNIER G, BEN HASSEN A: Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases. *Infection* 1989;17(5):347-54
43. ROSENBLATT JE, NEUMANN AM: A rapid slide test for penicillinase. *Am J Clin Pathol* 1978;69(3):351-54
44. SANDERS CC, SANDERS WE: Type-I beta-lactamases of Gram-negative bacteria interactions with beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1986;154:792-800
45. SCHEIFELE DW, VASSILIKI MD, HARDING L, EMERSON BB, SMITH AL: Evaluation of a rapid beta-lactamase test for detecting ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics* 1976;58(3):382-87

46. SLACK MPE, WHELDON DB, TURK DC: A rapid test for beta-lactamase production by *Hemophilus influenzae*. *Lancet* 1977; 2:906
47. SNG EH, YEO KL, RAJAN VS: Simple method for detecting penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Vener Dis* 1981; 57(2):141-42
48. STOCKLEY RA, DRAGICEVIC P, BURNETT D, HILL SL: Role of beta-lactamases in the response of pulmonary infections to amoxicillin/clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24(Suppl B):73-81
49. THORE M, JALAHAS K, ERIKSSON I, DORNBUSCH K: Evaluation of a disk approximation test of inducible beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 1989; 97(4):317-24
50. TILTON RC, HOWARD BJ: Antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and pathogenic microbiology* (Ed: HOWARD BJ) St Louis: The C.V. Mosby Company, 1987; 137-52
51. TOGSVERD E, MANSA B, KEIDING J: Studies on beta-lactamases from *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *APMIS* 1990; 98:345-52
52. TOKBAŞ A: Hastane enfeksiyonlarında etken olan bakteriler ve epidemiyolojisi. Hastane enfeksiyonları (Ed: KOŞAY S) İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 1981; 7-8
53. TOKBAŞ A, TOKBAŞ G, ULUSOY S: Çeşitli bakteriler üzerine sulbaktam+ampisilin kombinasyonunun in vitro etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. *İnfeks Derg* 1987; 1(2-3):151-55
54. TU KK, JORGENSEN JH, STRATTON CW: A rapid paper-disc test for penicillinase. *Am J Clin Pathol* 1981; 75(4):557-59
55. WEINBREN MJ, PERINPANAYAGAM RN: Test for beta-lactamase production. *Lancet* 1985; 2:673-74

56. WIEDEMANN B, KLIEBE C, KRESKEN M: The epidemiology of beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24(Suppl B): 1-22
57. WILLIAMS JD, CAVANAGH P: Ampicillin-resistant *Hemophilus influenzae* meningitis. *Lancet* 1974; 1: 864
58. YÜCE K, KARAKARTAL G, GÜNHAN C, BÜKE M, SERTER D, ERTEM E, HİLMİ S: Aminopenisilinlerin tekbaşına ve beta-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonlarının 100 *Escherichia coli* suşuna *in vitro* etkileri. *Ege Ü Tıp Fak Derg* 1988; 27(4): 1203-7
59. YÜCE K: Antibiyotikler ve infeksiyon hastalıklarında tedavi prensipleri. İzmir: Bilgehan Basımevi, 1988; 8-12