

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

GENİŞLEMİŞ-SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ÜRETEN *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.*
İZOLATLARINDA BETA LAKTAMAZ DİRENCİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahu KAMBUROĞLU

TRABZON-2011

T.C
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

GENİŞLEMİŞ-SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ÜRETEN *Escherichia coli* ve
Klebsiella spp. İZOLATLARINDA BETA LAKTAMAZ DİRENCİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI

AHU KAMBUROĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.08.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 01.07.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr.: Ahmet KALKAN

AĞUSTOS, 2011

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren insani ve mesleki tecrübeme büyük katkıları olan, her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve yaklaşımı ile örnek aldığım, çalışma azmini bana yansıtan ve tez çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a, yüksek lisans eğitimim süresince gerek ders gerekse tez dönemlerinde bana destek olan ve yol gösteren çok kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Prof. Dr. Faruk AYDIN, Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na teşekkür ederim. Lisans eğitimimden bu günlere kadar her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve birikimleri ile beni her konuda eğitmiş ve hala eğitmeye devam eden, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar araç ve gereçlerinin kullanılmasındaki desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ersan KALAY hocama teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında desteklerini benden esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Yeşim BEŞLİ, Araş. Gör. Necla CEBECİ GÜLER, Araş. Gör. Gülşen ULUÇAM ve Tıbbi Biyoloji A.D Yüksek lisans ögr. Adem YILDIRIM ve Araş. Gör. Burcu YÜCEL'e teşekkür ederim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunduğum süreçte birlikte emek sarf ettiğimiz yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve araştırma-rutin hizmet laboratuvarlarındaki çalışma arkadaşlarıma faydalı paylaşımları ve dostlukları için teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de hep yanımda olan ve hayatımın vazgeçilmez parçaları annem, babam ve kardeşlerime teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ahu KAMBUROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları	3
2.1.1. İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Etkenleri	4
2.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1.1.1. Morfoloji Özellikleri	4
2.1.1.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.1.1.1.3. Doğal Ortamı	5
2.1.1.1.4. Klinik Önemi	5
2.1.1.2. <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakteriler	6
2.1.1.2.1. Morfoloji Özellikleri	6
2.1.1.2.2. Kültür Özellikleri	6
2.1.1.2.3. Doğal ortamı	7
2.1.1.2.4. Klinik Önemi	7
2.1.2. İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	7
2.1.3. İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Antimikrobiyal Tedavisi	8
2.2. β -Laktam Antibiyotikler	9
2.2.1. Yapı ve Sınıflandırılmaları	9
2.3. β -Laktamların Etki Mekanizmaları	15
2.4. β -Laktam Direnci	15
2.5. Antibiyotik Direncinin Horizontal Transferi	17

2.5.1. Plazmidler	17
2.5.2. Transpozonlar	17
2.5.3. İntegronlar	18
2.6. β -Laktamaz Enzimleri	19
2.7. β -Laktamazların İsimlendirilmesi	19
2.8. β -Laktamazların Sınıflandırılması	21
2.9. Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar	23
2.9.1. GSBL Tipleri	24
2.9.1.1. TEM Grubu Enzimler	25
2.9.1.2. SHV Grubu Enzimler	25
2.9.1.3. CTX-M Grubu Enzimler	25
2.9.1.4. OXA Grubu Enzimler	26
2.9.1.5. İnhibitörlere dirençli (IRT) β -laktamazlar	26
2.9.1.6. Diğer GSBL'ler	26
2.10. GSBL'lerin Labaratuvar Tanısı	28
2.10.1. GSBL Tarama Testleri	28
2.10.2. GSBL Saptama ve Doğrulama Testleri	28
2.10.2.1. Kombine Disk Yöntemi	29
2.10.2.2. Çift Disk Sinerji Testi	29
2.10.2.3. E-Test Yöntemi	29
2.10.2.4. Sıvı (Broth) Mikrodilüsyon Yöntemi	30
2.10.2.5. Üç Boyutlu Test	30
2.10.2.6. Otomatize Sistemler	30
2.10.2.7. Moleküler Yöntemler	30
2.10.2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Klinik Bakteri İzolatları	33
3.1.2. Araç ve Gereçler	37
3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar	37
3.1.4. Solüsyonlar	37
3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	37
3.1.4.1.1. Tris HCl (1 M)	37

3.1.4.1.2. EDTA (0.5 M)	37
3.1.4.1.3. TE Tamponu	38
3.1.4.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar	38
3.1.4.2.1. dNTP Mix	38
3.1.4.2.2. Primer Mix	38
3.1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar	38
3.1.4.3.1. 5XTBE Tamponu	38
3.1.4.3.2. Yükleme Tamponu (Loading Buffer)	38
3.1.4.3.3. Etidyum Bromür Solüsyonu	38
3.2. Metod	39
3.2.1. Bakterilerin İdentifikasyonu ve Antibiyotik Direnç Paterninin Belirlenmesi	39
3.2.2. DNA İzolasyonu	39
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	40
3.2.3.1. Direnç Genlerinin Araştırılması	40
3.2.3.2. İntegröz ve İntegron Genlerinin Araştırılması	41
3.2.4. Master Mix Hazırlanması	42
3.2.5. Amplifikasyon	43
3.2.5.1. <i>bla</i> _{TEM} Geninin Amplifikasyonu	43
3.2.5.2. <i>bla</i> _{SHV} Geninin Amplifikasyonu	43
3.2.5.3. <i>bla</i> _{CTX-M} Geninin Amplifikasyonu	44
3.2.5.4. <i>bla</i> _{OXA} Geninin Amplifikasyonu	44
3.2.5.5. <i>intI-1</i> Geninin Amplifikasyonu	45
3.2.5.6. <i>intI-2</i> Geninin Amplifikasyonu	45
3.2.5.7. Sınıf 1 İntegron Amplifikasyon	46
3.2.5.8. Sınıf 2 İntegron Amplifikasyon	46
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	47
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
7. ÖZET	76
8. SUMMARY	77
9. KAYNAKLAR	78

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. β -laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	10
Tablo 2. Penisilinlerin Sınıflandırılması	11
Tablo 3. Sefalosporinlerin Sınıflandırılması	12
Tablo 4. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazların İsimlendirilmesi	20
Tablo 5. β -laktamazların Sınıflandırılması	22
Tablo 6. GSBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon Zonu ve MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) Değerleri	28
Tablo 7. İzole Edilen GSBL Pozitif Bakteri Türleri	34
Tablo 8. β -laktamaz Enzim Direncini Kodlayan Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Primerler	41
Tablo 9. İntegraz ve İntegronların Araştırılmasında Kullanılan Primerler	41
Tablo 10. PCR İçin Master mix Bileşenleri ve Miktarları	42
Tablo 11. İYE Etkeni <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> spp. İzolatlarında GSBL Varlığı	48
Tablo 12. Çalışmaya Dahil Edilen ve GSBL Üreten İzolatların Dağılımı	49
Tablo 13. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar ve Antibiyogram Sonuçları	50
Tablo 14. <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> spp. Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları	53
Tablo 15. Çalışma Grubuna Ait PCR Sonuçları	61
Tablo 16. Türlere Göre Direncin ve İntegron Varlığının Dağılımı	65
Tablo 17. İzolatlardaki Direnç Genlerinin Birlikte Bulunma Durumları	65

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. β -laktam halkası	9
Şekil 2. 6-aminopenisilanik asitin yapısı	10
Şekil 3. 7-aminosefalosporinik asitin yapısı	12
Şekil 4. Monobaktamın yapısı	14
Şekil 5. Karbapenemlerin yapısı	14
Şekil 6. Klavulonik asitin yapısı	15
Şekil 7. Sınıf 1 integronun yapısı	19

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. <i>bla</i> _{TEM} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	54
Resim 2. <i>bla</i> _{SHV} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	55
Resim 3. <i>bla</i> _{CTX-M} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	56
Resim 4. <i>bla</i> _{OXA} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	57
Resim 5. <i>intI-2</i> Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	58
Resim 6. Sınıf 1 İntegron Varlığının Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	59
Resim 7. Sınıf 2 İntegron Varlığının Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	60

KISALTMALAR

İYE: İdrar Yolu Enfeksiyonları

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta laktamaz

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SİYE: Semptomatik İdrar Yolu Enfeksiyonları

EMB: Eozin Metilen Blue

SS agar: Salmonella-Shigella agar

IMVIC: İndol, Metil red, Voges Proskauer, Sitrat

GİS: Gastrointestinal sistem

6-APA: 6-aminopenisilanik asit

7-ASA: 7 aminosefalosporinik asit

PBP: Penisilin bağlayan proteinler

OmpF: Outer membrane protein

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE) genel popülasyonda yer alan bakteriyel enfeksiyonlardan en yaygın olanıdır. İYE en sık hastaneye başvuru nedenlerinden biridir. Morbidite ve mortaliteye sebep olmanın yanı sıra ciddi ekonomik yüke de neden olurlar (1, 2).

İYE, etkenin kaynağına göre toplum kökenli (%57.4) veya hastane kökenli (%42.6) olabilmektedir (3). Hastane kökenli enfeksiyonlar arasında 2. sırada yer almaktadır (4, 5). İYE etkenleri arasında ilk iki sırayı *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. almaktadır. *E. coli* İYE'lerin %75-90'ından sorumludur. Daha az sıklıkta olmakla birlikte *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus* spp, *Enterococcus* spp. ve *Enterobacter* spp.'de üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (6, 7). İYE tedavisinde en yaygın sorun antimikrobiyal dirençtir. Direncin nedenleri arasında rekurrent enfeksiyonlarla birlikte tekrarlayan antimikrobiyal tedavi dönemleri ve toplum kaynaklılara göre daha dirençli olduğu varsayılan nozokomiyal kökenli İYE'nin olmasıdır. İYE etiolojisinde dominant rol oynayan gram negatif bakterilerde görülen dirençteki artış kaygı vericidir. Özellikle AmpC tipi ve geniş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) üreten bakterilerin insidansı ile birlikte çoklu ilaç direncinde artış tedavide sorunlara yol açmaktadır (1, 3).

β -laktamazların keşfedildiği yıllardan beri bu direncin üstesinden gelebilmek için üretilmiş olan her yeni antibiyotiğin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra, bakteriler tarafından geliştirilmiş ve modifiye edilmiş yeni bir β -laktamaz enzimiyle karşılaşmıştır. Özellikle hastanelerde saptanan antibiyotiklere dirençli bakterilerle mücadele edebilmek için β -laktamaza dayanıklı geniş spektrumlu sefalosporinler geliştirilmiş; fakat kısa bir süre sonra bu grup antibiyotiklere de direnç geliştiği saptanmıştır. Direnç mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarla, β -laktamaz enzimi üretiminden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu enzimin geniş etkili bu antibiyotikleri hidroliz etme yeteneği kazandığı gösterilmiştir (8). GSBL olarak adlandırılan bu enzimler kromozomal ya da plazmid kökenli olabilirler. Bu

enzimlerin plazmidler, transpozonlar ve integronlarla aktarılabilir olmaları antibiyotik direncinin artmasında önemli bir faktör olarak görülmektedir (9, 10).

İlk GSBL üreten organizma 1983 yılında Almanya'da bildirilmiştir. GSBL'ler penisilinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz eden ancak sefamisin veya karbapenemlere etkili olmayan ve klavulonik asit tarafından inhibe edilebilen enzimlerdir (11). GSBL'ler çoğunlukla plazmid kaynaklı β -laktamazlardır ve TEM-1, TEM-2 veya SHV-1 genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar ve yaygın olarak *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyeleri olan *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Enterobacter*'de saptanmıştır. 1983'den beri sürekli olarak GSBL varyantları artmaya devam etmektedir. Günümüzde 300 civarında farklı GSBL varyantı olduğu bilinmektedir (11, 12, 13).

GSBL üreten kökenlerle enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz vb. kateter uygulamaları türünden çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu β -laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı durumlarda artmaktadır. GSBL'ler tüm dünyada yayılmayı sürdürdüğü için antibiyotik tedavilerinin planlanmasında etkenin GSBL pozitif olup olmadığının bilinmesi büyük önem taşımaktadır (14).

GSBL üreten suşlar ve dirence neden olan genler, toplumlar ve bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir (15). Bölgemizde baskın olarak bulunan GSBL genlerinin bilinmesi, tedavinin planlanmasında ve koruyucu önlemlerin alınmasında yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakterioloji Birimi'nde idrar örneklerinden izole edilen GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında β -laktamaz enzim direncinin ve integron varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE) genel popülasyondaki en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardandır. ABD’de bir yıl içinde İYE şikayetiyle yaklaşık 8 milyon başvuru olmuştur. İYE hastaneye en sık başvuru nedenlerinin başında gelmektedir ve bununla birlikte morbidite ve mortalitenin yanında ciddi ekonomik yüke neden olmaktadır (16, 17). İYE etkenin kaynağına göre toplum kaynaklı (%57.4) veya hastane kaynaklı (%42.6) olabilmektedir (18). İYE’ler hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında ikinci sırada yer alırlar (4, 5).

İYE, enfeksiyonun yerine (alt-üst), konağın durumuna (komplike-nonkomplike) veya etiyolojik ajanın kaynağına (toplum-hastane kaynaklı) göre sınıflandırılırlar (19).

İYE’lerin çoğu toplum kaynaklıdır ve neden olan bakteriler arasında en sık görüleni *E. coli*’dir. Toplum kaynaklı İYE’ler komplike olmayan kişilerde (yapısal veya fonksiyonel anomalisi bulunmayan, hamile olmayan ve vücudunda kateter gibi herhangi bir yabancı cisim bulunmayan) meydana gelen enfeksiyonlardır (20).

Hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarında, hastane ortamından bulaşacak olan mikroorganizmaların sayısının fazla olması ve bu mikroorganizmalarda bulunan direnç genlerinin yayılması tedavide toplum kökenli İYE’lere göre daha çok sorun teşkil etmektedir (21).

2.1.1. İdrar Yolu Enfeksiyonlarının Etkenleri

İYE etkenleri arasında ilk iki sırayı *E. coli* ve *Klebsiella* spp. almaktadır. *E. coli* idrar yolu enfeksiyonlarının %75-90'undan sorumludur. Daha az sıklıkta olmakla birlikte *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus* spp. , *Enterococcus* spp. ve *Enterobacter* spp.'de üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan bakteriler arasında yer alır (6, 7).

2.1.1.1. *Escherichia coli*

2.1.1.1.1. Morfoloji Özellikleri

Escherichia coli, ilk kez 1855 yılında Escherich adında bir araştırmacı tarafından infantların dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ise izole eden kişinin adı verilerek *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alır ve kuşların, memelilerin normal barsak florasında bulunan 2-6 µm boyunda, 1-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak gram negatif bir basildir. Etraflarında yer alan kirpikleri sayesinde hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır. Bazı suşlarda kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır (22, 23).

2.1.1.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Fakültatif anaerob bakterilerden olan *E. coli*'ler, 15-45°C'de üreyebilmelerine rağmen optimal üreme ısıları 37°C'dir. Ortalama pH 7-7.2'de, buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Buyyon ve peptonlu suda yoğun üreme gösterirler ve homojen bulanıklık yaparlar. Agar yüzeyinde genellikle 2-3 mm çapında parlak, düzgün kenarlı, konveks, gri-beyaz renkte S tipi koloniler yaparlar. Tekrarlanan pasajlarda ise kaba-mat ve granüler R tipi koloniler oluştururlar. Özellikle İYE'den soyutlanan bazı kökenler kanlı agarda hemoliz yapabilirler. Kapsüllü suşlar ise mukoid koloniler oluşturabilirler. Şekerleri ve diğer karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. İçinde laktoz ve eozin metilen mavisi bulunan eozin metilen blue (EMB) agarda mavi-siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler oluştururken, McConkey ve Salmonella-Shigella (SS) agarda pembe-kırmızı koloniler oluştururlar (22, 23, 24).

E. coli bakterilerinin IMVIC olarak bilinen biyokimyasal özellikleri (Triptofandan indol oluşturma, Metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, sitratı kullanma) (+ + - -) olarak gösterilir. Ayrıca oksidaz negatif olup üreyi parçalayamazlar. Bazı kökenleri dışında hidrojen

sülfür (H₂S) oluşturamazlar, ancak sisteinli besiyerinde az miktarda H₂S yaptıkları saptanmıştır. Katalaz pozitif, potasyum siyanür testi olumsuzdur (22, 23).

E. coli dış etkilere oldukça dayanıklı bir bakteridir. 55°C’de bir saat, 60°C’ de 20-30 dakika, oda ısısında uzun süre canlı kalabilme özelliklerine sahiptirler. Soğuğa dirençli ve dezenfektanlara karşı dirençsiz olmaları diğer özellikleridir. *E. coli*’nin O (somatik), H (kirpik), K (kapsül) antijenleri bulunmaktadır. O antijenlerine göre gruplara, H ve K antijenleriyle de serotiplere ayrılır (22, 24).

2.1.1.1.3. Doğal Ortamı

E. coli kuşların ve memelilerin normal barsak florasında bulunur. Burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge içinde kaldığı sürece hastalık oluşturmaz. Normal koşullarda kokuşma (putrefaksiyon) ve fermentasyonun düzenlenmesinde ve besinlerin sindirilmesi ile ilgili bazı hususlarda yardımcı olur. Ancak *E. coli* suşları insanlar ve hayvanlar için patojen olup barsak hastalıklarına neden olabilir. Barsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardır (25).

2.1.1.1.4. Klinik Önemi

Özellikle idrar yolları, safra kesesi, periton ve meninkslere ulaşan *E. coli* önemli hastalıklara yol açar. Yeni doğanlarda, yaşlılarda bazı hastalıkların terminal dönemlerinde, immünsüprese durumlarda, venöz ve üretra kateterizasyonları gibi organizmanın savunma gücünün azaldığı durumlarda koliform bakterilerin dokulara ve kana yayılması için gerekli koşullar ortaya çıkabilir (25). *E. coli*’nin neden olduğu hastalıkları, gastrointestinal sistem (GİS) enfeksiyonları ve diğer doku enfeksiyonları olarak iki gruba ayırabiliriz. Daha çok diyare sendromu şeklinde ortaya çıkan GİS enfeksiyonları, *E. coli*’nin ‘‘O’’ serotipleri tarafından meydana getirilirler. Küçük çocuklarda ortaya çıkan ishaller daha çok kreşlerde salgınlar şeklinde görülür. Erişkinler çoğu kez hasta çocuklardan enfekte olurlar. Bununla beraber turist diyaresinden sorumlu etkenin enteropatojenik *E. coli* suşları olduğu bilinmektedir. Ağır ishal olgularında bu suşlar çocukların ince barsaklarında hatta duodenumda bol sayıda bulunmaktadırlar. Değişik mekanizmalarla ishale neden olan *E. coli*’lerin 6 tipi tanımlanmıştır (25, 26, 27).

1. Enterotoksijenik *E. coli*
2. Enterohemorajik *E. coli*
3. Enteroinvazif *E. coli*
4. Enteropatojenik *E. coli*
5. Enteroagregatif *E. coli*
6. Diffüz adezif *E. coli*

2.1.1.2. *Klebsiella* Cinsi Bakteriler

2.1.1.2.1. Morfoloji Özellikleri

Klebsiella cinsi adını 19. yüzyılın sonlarında yaşamış mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinin *Klebsiellae* sınıfında *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* ile birlikte yer alır. *Enterobacteriaceae* ailesinin özelliklerini gösteren hareketsiz, sporsuz, çoğunlukla kapsüllü, 0.7-1.5 x 2.0- 5.0 µm boyutlarında, bazen ikişer ikişer bazen kısa zincir oluşturan çomak şeklinde bakterilerdir (25).

2.1.1.2.2. Kültür Özellikleri

Klebsiellalar gram negatif bakteriler olup bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar. *Klebsiella*'da bulunan kapsül, organizmadan yeni ayrılan ve hastalık materyali içindeki bakterilerde belirgin bir şekilde görülür. Kanlı, serumlu besiyerlerinde kapsüllerini saklı tutarlar. En iyi glikozlu besiyerlerinde kapsüllenirler (25).

Klebsiellalar tüm barsak bakterileri gibi genel kullanım besiyerlerinde kolayca ürerler. Ortalama pH:7 ve üremeleri için en iyi ortam 37°C'dir. Buyyon gibi sıvı besiyerlerinde homojen bir bulanıklık ve dipte mukoid bir çöküntü yaparak ürerler. Katı besiyerlerindeki kolonileri tipik mukoid nitelikte, büyük, sarımtırak gri renkte ve M tipi kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda S ve R tipi kolonilere dönüşebilirler. Aerop ve fakültatif anaerop olup üredikleri ortama bol kapsül maddesi salarlar. Başta glikoz olmak üzere mannitol, salisin, adonitol, inozitol ve sorbitolden, çoğu kez de laktoz ve sukrozdan gaz oluşturmak suretiyle birçok şekeri parçalarlar. Nişastadan gaz oluşturmaları önemli bir özellikleridir. H₂S oluşturmazlar. Özellikle solunum sisteminden ayrılan bazı kökenler değişik biyokimyasal reaksiyonlar verebilirler. Klebsiellalar fenilalanini deamine etmezler. Az bir kısmı dışında jelatinaz, ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar (25, 28).

Klebsiellalar ısıya dayanıksızdırlar ve nemli ısıda 55°C’de yarım saatte ölürlür. Ancak kuruluğa karşı oldukça dirençli olup özellikle kurutulmuş organik maddeler içinde aylarca canlı kalabilme özelliğine sahiptirler. Oda ısısında kalan kültürlerde haftalarca, +4°C’de ise aylarca canlı kalırlar. Antibiyotiklere karşı oldukça dirençlidirler ve bu direnç oranı *E. coli*’ye göre daha fazladır. Hastane ortamından izole edilen kökenlerde dirençlilik düzeyi çok yüksektir.

2.1.1.2.3. Doğal ortamı

Klebsiella spp., toprakta, sulara, insan ve hayvanların barsakları ile üst solunum yollarının normal florasında bulunurlar (25).

2.1.1.2.4. Klinik Önemi

Klebsiellalar, insanların %5’inin barsak ve üst solunum yolları florasında bulunurlar. Üst solunum yolu ve barsak florasında bulunabilen Klebsiellalar’ın buldukları yerde uygun koşulların oluşması veya yer değiştirerek diğer organ ve sistemlere geçmeleri halinde, birçok hastalığa neden olurlar. Son zamanlarda özellikle hastane ortamlarında antibiyotiklere karşı direnç kazanmış kökenlerin hastane enfeksiyonlarına neden olmaları bu bakterilerin önemini arttırmıştır. Bakteriyel pnömonilerin yaklaşık %2’sine bu bakteriler neden olur. Akciğerlerde nekrozlar ve hemorajik konsolidasyonlarla seyreden ağır bir pnömoniye neden olurlar. Bunun dışında idrar yollarına ve prostat, periton, meninksler, kulak ve sinüs boşlukları gibi organlara yerleşerek ve kana yayılarak çeşitli tipte ve önemde enfeksiyonlara neden olurlar (25).

2.1.2. İdrar Yolu Enfeksiyonu Laboratuvar Tanısı

İdrar yolu enfeksiyonu tanısında yalnızca idrar sedimentinde pyüri saptanması yeterli değildir (29). Tanıda anamnez, fizik muayene ve idrar kültürü göz ardı edilmemelidir (30). İdrar yolu enfeksiyonu düşünülen her hastada mutlaka fizik muayene yapılmalı ve ayrıca tanıya yardımcı, basit, ucuz, her laboratuvarında yapılabilen sedimantasyon, lökosit sayımı ve CRP tayini yapılmalıdır. Bir hastaya idrar yolu enfeksiyonu tanısı koyabilmek için üç parametreye gereksinim vardır: 1-İdrar yolu enfeksiyonuna ait klinik belirti ve bulgular; 2-İdrar yolunun bakteriyel invazyonuna karşı ortaya çıkan inflamatuvar yanıt/nötropenik hastalar dışında; 3-İdrar kültüründe bakteriüri saptanması.

Bir hastaya bakteriyel idrar yolu enfeksiyonu tanısı koymak için üç parametreni de bulunması gerekir. İdrar örneği, 2000/devir/dk, 5 dk. Santrifüj edilerek, 40X büyütme ile

incelendiğinde; her sahada 5-10'dan fazla lökosit görülmesi pyüri karşılığıdır. Bu yöntemin standardizasyonu oldukça güçtür. En iyi ve standart yöntem, taze santrifüj edilmemiş idrarda kamarada lökosit sayımıdır. Milimetreküpte 10 veya daha fazla lökosit pyüriyi gösterir. Benzer fakat sayım yapılamayan bir yöntem, taze santrifüj edilmemiş idrarın lam-lamel arası incelenmesidir. Her sahada en az 1 lökosit görülmesi pyüri karşılığıdır. Lökosit esteraz testi de pyüri saptanmasında oldukça duyarlı ve özgül bir yöntemdir.

İdrarda bakteri bulunması bakteriüri olarak adlandırılır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğu hala idrarın ml'sinde >105 koloni oluşturan bakteri üremesini anlamlı bakteriüri olarak kabul etmektedir. İdrar yolu enfeksiyon semptomları ve pyürisi olan bir hastadan elde edilmiş orta akım idrarının ml'sinde saf kültür halinde üreyen 103 kadar *E. coli* veya *S. Saprophyticus* kolonisi bile artık idrar yolu enfeksiyonu göstergesi olarak kabul edilmektedir. İdrar kültüründe hiçbir üreme olmamasına veya ml'de 1000'den az bakteri üremesine karşın, pyürinin olmaması durumu steril pyüri olarak adlandırılır.

2.1.3. İdrar Yolu Enfeksiyon Tedavisi

Komplike olmayan ve toplum kökenli İYE'lerde idrar kültürü yaygın değildir ve tedavi genel olarak empiriktir. İYE tedavisinde hastanın yaşı, cinsiyeti, altta yatan başka bir hastalığının olup olmadığı oldukça önemlidir. Ayrıca enfeksiyona neden olan ajanın bilinmesi ve bu enfeksiyonun idrar yolunun hangi kısmını tuttuğu da tedavide kullanılacak antibiyotiklerin seçilmesinde önemlidir. TPM/SMX, siprofloksasin, sefalosporin, β -laktamaz inhibitörlü veya inhibitörsüz yarı sentetik penisilinler, nitrofurantoin ve fosfomisin toplum kaynaklı İYE tedavisinde en yaygın kullanılan antibiyotiklerdendir (32).

Yapılan surveyans çalışmalarında ampisilin ve trimethoprim/sulfamethoksazole (TPM/SMX) direnci %60-70, siprofloksasin direnci %5 olarak bulunmuştur (19).

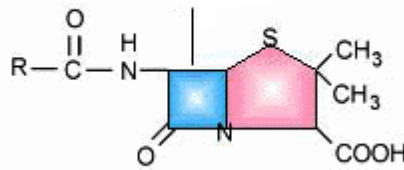
Yapılan çalışmalar göstermiştir ki β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç her geçen gün artmaktadır (16, 18). Dahası, β -laktam direnci kendisiyle birlikte organize farklı antibiyotik direnç genlerini kodlayan üniteler halinde taşınabilmekte ve yayılabilmektedir (33, 34). Bu genomik direnç adaları bazı bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların gelecekteki tedavilerinin daha da karmaşık olabileceğini göstermektedir (35).

2.2. β -Laktam Antibiyotikler

Molekülünün antibakteriyel etkinlikten sorumlu çekirdek kısmında β -laktam halkası içeren antibiyotiklere β -laktam antibiyotikler veya β -laktamlar adı verilir (36). Tıp alanında kullanılmaya başlanan ilk antibiyotiklerden olan penisilinlerin keşfinden 60 yılı aşkın süre geçmesine rağmen β -laktam antibiyotikler, günümüzde birçok hastalığın tedavisinde vazgeçilmezliğini korumaktadır (37). Tüm dünyada en çok kullanılan β -laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren antibakteriyel kemoterapötiklerdir (36).

2.2.1. Yapı ve Sınıflandırılmaları

β -laktam halkası biri azot, üçü karbon olan 4 üyeli doymuş heterosiklik bir halkadır (Şekil 1).



Şekil 1: β -laktam halkası (38)

Klinik olarak önemli β -laktamların büyük bölümü penisilin (penam) ve sefalosporin (sefem) gruplarına dahildir. Ayrıca, bu grup karbapenemler (örneğin; imipenem), monobaktamlar (örneğin; aztreonam) ve β -laktamaz inhibitörlerini de (örneğin; klavulonat) içerirler (Tablo 1). Bunlardan monobaktamlar hariç diğerlerinde molekülün çekirdeği bisiklik yapı gösterir ve β -laktam halkası, beş veya altı üyeli ikinci bir halka ile füzyon yapmıştır. İkinci halka karbapenemler hariç heterosiklidir. Monobaktamlarda β -laktam halkası tek başına bulunur (36).

Karbapenemler ve monobaktamlar yeni geliştirilen β -laktamlardır. Klavam türevi olan β -laktamaz inhibitörlerinin antibakteriyel etkinliği çok zayıftır veya hiç yoktur. Genellikle uygun bir β -laktamla birlikte kullanıldığında etkilidirler (36).

Tablo 1: β -laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması (38)**I. Penisilinler****II. Sefalosporinler****III. Diğer β -laktam antibiyotikler**

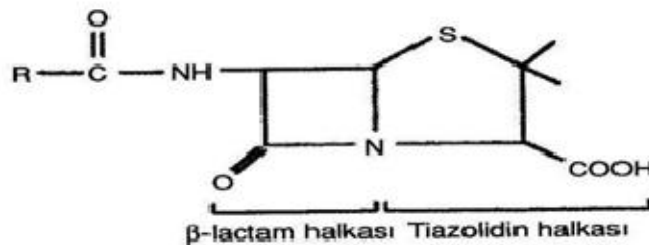
-Monobaktamlar

-Karbapenemler

IV. β -Laktamaz inhibitörleri**I. Penisilinler**

Güçlü bakterisit etkili ve son derece düşük toksisiteli olmalarına rağmen oldukça etkili antibiyotiklerdir. Bütün penisilinlerde ana yapıyı *Penicillium cyrysogenum* küfünün kültüründen elde edilen 6-aminopenisilanik (6-APA) halkalı bir organik asit oluşturur. 6-APA, tiazolidin halkası ve β -laktam halkasından oluşan bir yapıdır (39).

Penisilinler, β -laktam halkasındaki amino grubu üzerindeki yan zincirde meydana gelen değişikliklerle birbirlerinden ayrılırlar. Yan zincirde meydana gelen bu değişiklikler ilacın antibakteriyel özelliklerini değiştirebilir. Penisilinler, β -laktam halkasının amino grubu üzerindeki yan zincirin türüne göre üç gruba ayrılırlar (38).

**Şekil 2:** 6-aminopenisilanik asitin yapısı (38)

Tablo 2: Penisilinlerin Sınıflandırılması (38)**1) Doğal Penisilinler**

Benzil Penisilin (penisilin G)

Fenoksimetil penisilin (penisilin V)

2) Yarı Sentetik Penisilinler**- Penisilinaz dirençli**

Metisilin

Nafsilin

Kloksasilin

Dikloksasilin

Oksasilin

- Geniş spektrumlu**Aminopenisilinler**

Ampisilin

Amoksisilin

Bakampisilin

Pivampisilin

- Karboksipenisilinler

Karbenisilin

Tikarsilin

- Ureidopenisilinler

Azlosilin

Mezlosilin

Piperasilin

3) Penisilin+ β -laktamaz İnhibitör Kombinasyonu

Ampisilin - sulbaktam

Tikarsilin - klavulanat

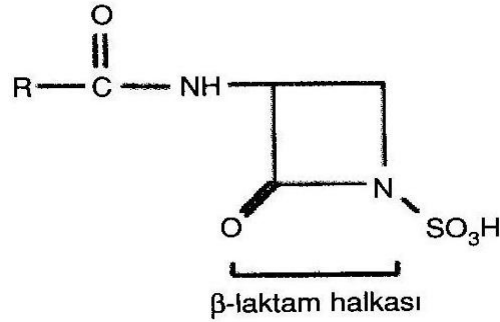
Amoksisilin - klavulanat

Piperasilin - tazobaktam

II- Sefalosporinler

β -laktam türevi olan sefalosporinler kimyasal yapıları, antibakteriyel etki mekanizmaları ve spektrumları yönünden penisilinlere yakından benzerler. Az sayıdaki bazı üyeler gerçekte

sefalosporin yapısında değildirler ve sefamisin ya da oksasefem türevidirler. Sefalosporinlerin ana çekirdeğini sefam türeviden olan 7 aminosefalosporanik asit (7-ASA) oluşturur.



Şekil 3: 7-aminosefalosporanik asitin yapısı (38)

7 ASA, *Cephalosporium acremonium* türü bir mantarın kültürlerinde oluşan bir fermentasyon ürünüdür. İlaç olarak kullanılan sefalosporinler, 7 ASA'dan türetilen yarı-sentetik ilaçlardır. 7-ASA çekirdeği β -laktam halkası içermesi sebebiyle penisilinlerin ana çekirdeği olan 6-APA'ya benzerlik gösterir. Ancak 7-ASA çekirdeğindeki β -laktam halkası, tiazolidin halkası ile değil altılı bir halka olan dihidrotiazin halkası ile kondanse olmuştur. Bu özellik β -laktam halkasının, bazı bakterilerin ürettiği doğal penisilinazlar dahil çoğu β -laktamaz enzimlerine karşı dayanıklı olmasını sağlar. Fakat sefalosporinazları içeren grup 1 β -laktamazlar tarafından yıkılırlar (36). Sefalosporinler antibakteriyel aktivitelerinin genel özellikleri dikkate alınarak 4 grupta sınıflandırılmıştır (38).

Tablo 3: Sefalosporinlerin Sınıflandırılması (38)

1) I. Kuşak Sefalosporinler

Sefadroksil	Sefalotin
Sefazolin	Sefapirin
Sefaleksim	Sefradin
Sefaloridin	

2) II. Kuşak Sefalosporinler

Sefaklor	Lorakarbef
Sefamandol	Sefmetazol
Sefonisid	Sefotetan
Seforanid	Sefoksitin
Sefuroksim	
Sefprozil	

3) III. Kuşak Sefalosporinler

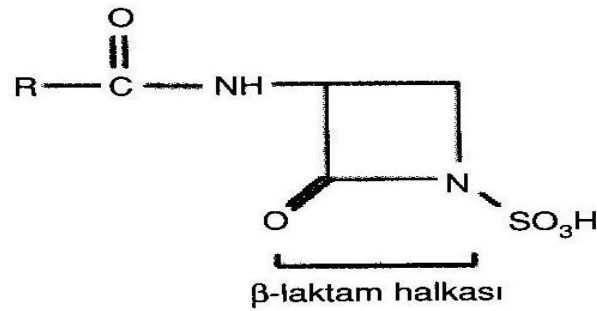
Sefdinir	Sefpodoksim
Sefditoren	Seftazidim
Sefiksim	Seftibuten
Sefoperazon	Seftizoksım
Sefotaksim	Seftriakson

4) IV. Kuşak Sefalosporinler

Sefepim
Sefpirom

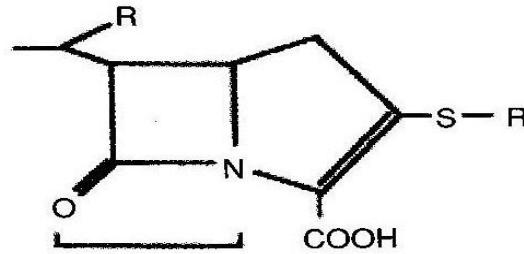
III- Diğer β -Laktam Antibiyotikler

Monobaktamlar: Günümüzde klinik kullanımda olan tek monobaktam antibiyotik aztreonamdır (38). Molekülündeki yan zincirler bakımından 3. kuşak sefalosporinlerden seftazidime benzer (Şekil 4). Bu yan zincirler nedeniyle seftazidim gibi gram negatif bakterilerin ürettiği β -laktamazların çoğuna karşı aşırı derecede dayanıklıdır. Böylece aerobik gram negatif bakterilere karşı etkinliği güçlendirilmiştir (36).



Şekil 4: Monobaktamın yapısı (38)

Karbapenemler: Günümüzde mevcut olan antibiyotiklerden antibakteriyel spektrumu en geniş olanlarıdır. İmipenem, meropenem ve ertapenem klinik kullanımları olan karbapenemlerdir. Yapısal olarak 6 pozisyonundaki trans konfigürasyonda bir hidroksietil yan zincire sahip olması ve bisiklik nükleusta bir sülfür veya oksijen atomunun eksik olmasıyla diğer β -laktamlardan ayrılırlar (38).

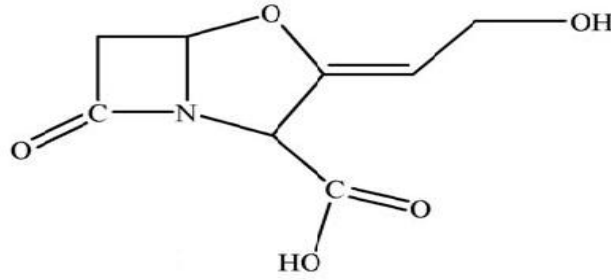


Şekil 5: Karbapenemlerin yapısı (38)

IV. β -Laktamaz İnhibitörleri

β -laktamazları geri dönüşümsüz olarak inhibe eden ve bakteri çeperindeki penisilin bağlayan proteinlere bağlanmayan maddelerdir. Bunlar klavulonik asit (Şekil 6), sulbaktam ve tazobaktamdır. Bu maddeler β -laktamazların “intihar ettiren inhibitör” (suicidal inhibitör) tipi geri dönüşümsüz inhibitörüdürler. Önce β -laktamazlar tarafından küçük molekül parçalarına ayrılırlar. Bunlardan biri enzimi geri dönüşümsüz olarak inaktive eder (enzimin intiharına yol

açar). Ancak az sayıda β -laktamaz türü bu maddelere dayanıklıdır. Amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat, ampisilin-sulbaktam ve piperasilin-tazobaktam β -laktamaz inhibitörlerin penisilinlerle olan kombinasyonlarıdır (36).



Şekil 6: Klavulanik asitin yapısı (36)

2.3. β -Laktamların Etki mekanizmaları

Antibiyotiklerin etkili olabilmeleri için bakteri hücresi içine girerek metabolize ya da inaktive olmadan bakterinin belli bir fonksiyonunu inhibe etmeleri gerekmektedir (40). Bakterilerin çoğunda hücre duvarının ana yapı maddesi peptidoglikan tabakadır. Peptidoglikanın temel yapısı N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asit moleküllerinin sıralanmasıyla oluşan bir zincirdir. Bu zincirler peptid bağları ile çapraz bağlanarak bakteriyi saran sert bir kafes oluşturur. Zincir ve çapraz bağların yapımı, geniş bir aile olan serin proteazlar üyesi olan bazı özel enzimlerce katalize edilir. Bu düzenleyici enzimler transpeptidazlar, transglukozilazlar ve karboksipeptidazlardır. Bu enzimler penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak da bilinirler (38). 1975'te Spratt β -laktam antibiyotiklerin hedef molekülünün PBP'ler olduğunu tanımlamıştır. β -laktam antibiyotikler kovalent bağlarla bu moleküllere bağlanırlar, peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve böylece bakteri üremesini engellerler (41, 42, 43).

2.4. β -Laktam Direnci

Yeni antibakteriyel ilaçların kullanıma girmesiyle bakteriler çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal dirence sahip

olabildikleri gibi kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya plazmid, transpozon gibi yapılarla kromozom dışı genetik materyal kazanılması ile sonradan da direnç geliştirebilmektedirler. Direnç gelişiminde enzim üretimi, bağlanma noktalarında meydana gelen değişiklikler, membran geçirgenliğinin azalması ve membran pompası gibi çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Bakteriler başlıca dört mekanizma ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazanmaktadır (44, 45).

1) Enzimler Yoluyla İlacın İnaktive Edilmesi: Enzimatik yolla inaktivasyon esas olarak β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen β -laktamaz enzimleriyle olmaktadır. Periplazmik aralıkta yerleşmiş olan veya buradan hücre dışına salınan bu enzimler tarafından antibiyotiklerin inaktive edilmesiyle direnç kazanılmaktadır (45).

2) Antibiyotiğin Hedefindeki Değişiklik: β -laktam antibiyotiklerin hedefi bakteri hücre duvarında bulunan ve PBP olarak adlandırılan transpeptidaz enziminin aktif bölgesidir. Bakteriler bu proteinlerdeki mutasyonel değişiklik, proteinin aşırı sentezi, düşük afiniteli başka bir PBP sentezlenmesi gibi mekanizmalarla direnç geliştirebilmektedirler (44).

3) Hücreye Giren Antibiyotiğin (Efluks) Dışarı Pompalanması: Direnç mekanizmalarında diğer bir yol ilacın ATP bağımlı aktif pompa mekanizmasıyla hücre içinden hücre dışına pompalanmasıdır. Bu direnç mekanizması, gram pozitif bakteri hücre duvarının tek tabakalı peptidoglikan içermesine karşın gram negatif bakteri hücre duvarının iç ve dış plazma membranı ve periplazmik aralıktan oluşan yapısı sebebiyle gram negatif bakterilerin β -laktam direncinde önem kazanmıştır (45).

4) İlacın Hücre İçine Girişinin Engellenmesi (Geçirgenlik Azalması): Antibiyotiklerin etki göstermeleri için hücre içindeki etki gösterecekleri yapılara kadar penetre olmaları gerekir ve ilk geçmeleri gereken yapı hücre duvarıdır. β -laktam antibiyotiklerin hedefi olan PBP'lere ulaşabilmek için hücre duvarındaki porin adı verilen kanallardan geçmeleri gerekir. Bu kanallar gram negatiflerde büyük OmpF (Outer membrane protein), küçük OmpC kanalı ve mutant phoE kanallarından oluşur. Bakteriler hücre duvarındaki porin kanallarını azaltarak veya yapılarında değişiklik yaparak hücre içine giren antibiyotik miktarını azaltırlar ya da tümüyle engellerler (46).

2.5. Antibiyotik Direncinin Horizontal Transferi

Farklı bakteri türleri veya aynı türler arasında direnç genlerinin yayılımı konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon gibi gen aktarım yollarıyla meydana gelmektedir. Horizontal gen transferinde önemli olan iki faktör vardır. Bunlardan ilki yeterli sayıda bakteri yoğunluğunun bulunması, diğeri ise transfer edilmiş genin hareketli genetik element üzerindeki yeridir. Söz konusu hareketli elementler plazmidleri, transpozonları, integronları, gen kasetlerini ve kromozomal genomik adaları içerirler.

Ekstrakromozomal direnç çeşitli yollarla aktarılan plazmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elemanlara bağlıdır (47).

2.5.1. Plazmidler

Bakterilerde antibiyotik uygulamasından önce de var olan ve kromozomdan bağımsız şekilde replike olabilen çift zincirli DNA parçalarıdır. Direnç faktörleri (R faktörler) bir veya birkaç antimikrobiyal ilaca ve ağır metallere karşı direnç genlerini taşıyan plazmidlerdir. R faktörleri ilaca direnç oluşturmalarının yanında iki önemli niteliğe daha sahiptirler. Bunlardan ilki bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabildiklerinden bir hücrede çok sayıda kopyaya sahip olmaları, ikincisi ise bunların sadece aynı türün hücreleri arasında değil aynı zamanda diğer tür ve cinslere ait hücrelere de aktarılabilir olmalarıdır. Bulaşıcı tipteki bu direnç daha çok antibiyotiği inaktive eden veya hücrenin permeabilitesini değiştiren enzimlerle olmaktadır. Antibiyotik kullanımı direnç genlerini taşıyan bakteriler yararına bir seleksiyona yol açmakta ve antibiyotik kullanımının yoğun olduğu yerlerde özellikle hastanelerde dirençli bakterilerin artışına sebep olmaktadır.

Plazmidler; transpozonlar, integronlar/gen kasetleri için vektör olarak rol oynayabilirler (47, 48). Plazmidler “incompatibility”(Inc) gruplar içindeki replikasyon orjinlerine göre sınıflandırılırlar. Aynı replikasyon orjinine sahip plazmidler “incompatible” olarak adlandırılırken, farklı replikasyon orjinine sahip plazmidler ise “compatible” olarak isimlendirilirler (44).

2.5.2. Transpozonlar

Bakteri kromozomunun değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmiden plazmide, plazmiden DNA veya bakteriyofaja aktarılabilen ve kendi kendilerine replike olmayan çift zincirli DNA dizileridir (45, 46). Transpozonların iki çeşidi vardır.

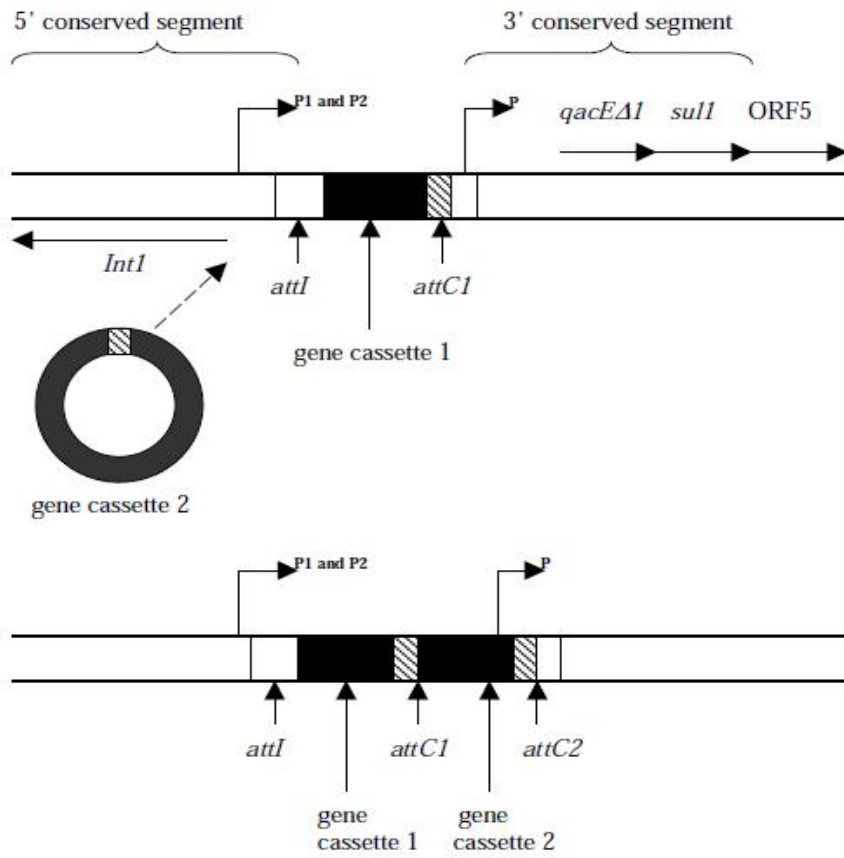
Büyük transpozonlar konjugatif olarak görev yaparken küçük transpozonlar yalnızca plazmidin bir parçası olarak başka bir hücreye entegre olurlar. Transpozonların bakteri hücreleri içinde yer değiştirme özellikleri vardır (47). Bu açıdan transpozonlar spesifik bölgelere entegre olurlar. Oysa horizontal transferde görevli diğer yapıların bilinen bir tercih olmaksızın konak DNA'nın içine entegre olma özellikleri vardır (52).

2.5.3. İntegronlar

Kromozom ya da plazmid üzerindeki antibiyotik direnç genlerinin birbiri ile bağlantılı olduğu ve bu genlerin başlangıç bölgesinin yakınında özel integrasyon birimleri bulunduğu gözlenmiş ve bunlara integron adı verilmiştir. İntegronlar rekombinasyonun çok sık görüldüğü sıcak noktaları içeren hareketli elementlerdir ve gram negatif bakterilerde antimikrobiyal direncin yayılımında ve direnç genlerinin taşınmasında önemli rol oynarlar (51, 53). Ayrıca doğal klonlama ve ekspresyon vektörü olarak da bilinirler. Bunlar entegrasyon veya eksizyon ile gen kasetlerinin arasına girerler ve gen kasetlerini fonksiyonel hale getirirler (54, 55, 56, 57, 58).

Antimikrobiyal direnç geni taşınmasında rol oynayan üç çeşit integron vardır. Bunlar Sınıf 1, Sınıf 2 ve Sınıf 3 integronlardır (59, 60). Gram negatif bakterilerde en yaygın olan integronlar Sınıf 1 ve 2'dir. Sınıf 1 ve 2 integronlarda 5'-CS ve 3'-CS diye adlandırılan korunmuş bölgeler vardır ve bu integronlar bir veya daha fazla gen kaseti içerirler (47). İntegronların yapısına baktığımızda üç önemli bileşen karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan ilki entegrasyonun gerçekleştiği integras (intI) gen bölgesidir. Diğerleri ise yapışmada görevli attI bölgesi ve entegre edilmiş gen kasetlerinin ekspresyonu için önemli olan promotor bölgesidir (55). İntegronların yapısında bulunan 5'-CS bölgesi integras gen, yapışma bölgesi ve promotor bölgeyi içerirken; 3'-CS bölgesi ise qacEΔ1 geni, sulfonamid geni (sulI) ve ORF (open reading frame) yapılarını içerir (47, 54, 55).

İntegronlar kendi kendilerine hareket edemezler. Plazmidler üzerine yerleşirler ya da Tn1696 gibi transpoze edilebilir bir elementin içine entegre olur ve bu şekilde yayılırlar (61). Bunun yanında integronlar kromozomal DNA veya kromozomal genomik adalara da yerleşebilirler (62).



Şekil 7: Sınıf 1 integronun yapısı (63)

2.6. β -Laktamaz Enzimleri

Penisilinin geliştirilmesinden sonraki yirmi yıl içinde penisilnaz sentezleyen stafilokoklar tüm dünyada yayılmış, 1960'lardan sonra yarı sentetik penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlerin keşfedilmesi ile *Enterobacteriaceae* ailesinde β -laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Uzun bir süre β -laktamazlar birkaç çeşit ile sınırlı kalmış, ancak 1978'den sonra birçok yeni β -laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile β -laktamazların sayısı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir (64).

2.7. β -Laktamazların İsimlendirilmesi

β -laktamazların isimlendirilmesi konusunda farklı görüşlerin olması bu enzimleri gördüklerinden daha karmaşık bir hale getirmiştir. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara

göre (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), genlerine göre (*Amp-C*, *CepA*), izole edildikleri bakterilere göre (AER, PSE), suşlara göre (P99), izole edildikleri hasta isimlerine göre (TEM, ROB), izole edildikleri hastaneye (MIR, RHH) ve eyaletlere (OHIO) ya da bulan kişilere (HMS) göre isimlendirilmiştir ancak bazıları zamanla geçerliliklerini yitirmişlerdir. Örneğin SHV, sülfidril variable'dan kısaltılmış olmasına rağmen artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas*'dan izole edilmiş olan PSE enziminin artık *Enterobacteriaceae*'larda bulunabildiği bilinmektedir. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitör rezistan) gibi tanımlayıcı isimler verilmesi karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise, TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM 26, TEM 43 gibi numara ile belirtilmesidir (8, 65).

Tablo 4: Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazların İsimlendirilmesi (66)

β -laktamaz ismi	Yıl ^a	Varyant sayısı	İsmin orjini
SHV tip	1983	>100	<u>S</u> ulphhydryl <u>v</u> ariable
TEM tip	1985	>160	<u>T</u> emoneira (Hastanın ön adı)
CTX-M tip	1989	>65	Cefotaximase- <u>M</u> unich
SFO-1	1988	1	<u>S</u> erratia <u>f</u> onticola
TLA-1	1991	1	<u>T</u> lahuicas (Hindistan kabilesi)
PER	1991	3	<u>P</u> seudomonas <u>e</u> xtended <u>r</u> esistance
VEB	1996	5	<u>V</u> ietnam <u>e</u> xtended-spectrum β -lactamase
BES-1	1996	1	<u>B</u> razilian <u>E</u> SBLs
GES	1998	9	<u>G</u> uyana <u>E</u> SBLs
BEL-1	2005	1	<u>B</u> elgium <u>E</u> SBLs
OXA	1991	En az 9	Oksasilin>penisilin hidrolizi

^aİlk kaydedildiği yıl

2.8. β -Laktamazların Sınıflandırılması

β -laktamazların sınıflandırılmasında da farklı yaklaşımlar sergilenmiştir. Önceleri yapılan sınıflandırmada biyokimyasal aktivite ve substrat profillerine göre, genetik direnç belirleyicilerinin yerlerine göre (plazmid, kromozom), izoelektrik odaklama çalışmaları ve enzim kinetiklerinin verilerine göre sınıflandırma yapılmıştır. Sonradan moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, dizi homolojisi çalışmaları ile enzimlerin moleküler yapısının belirlenmesi, sınıflandırmanın zorluklarının aşılmasını kolaylaştırmıştır. Ancak henüz tüm β -laktamazlar için aminoasit dizilerine dayanan bir moleküler sınıflandırma geliştirilememiştir (67).

1940 yılında Abraham ve Chain'in bildirdikleri penisilinaz ile birlikte β -laktamazların ilk sınıflandırılması yapılmıştır. Bundan sonra yapılan ve kabul gören ilk sınıflandırma Sawai ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırma olmuştur. Bu sınıflandırmada enzimler penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayrılmış ayrıca antiserum ile reaksiyonu da buna eklemiştir. 1973 yılında Richmond ve Sykes tüm gram negatif β -laktamazları substrat profillerine göre beş grupta toplamıştır. Daha sonra Matthew, β -laktamazların izoelektrik odaklama ile tanımlanabileceğini gösterdikten sonra sınıflandırma 1976'da Sykes ve Matthew tarafından tekrar düzenlenmiştir (68).

1980'de Ambler'in moleküler yapıya dayanan sınıflandırmasını takiben 1989'da Bush tarafından önerilen grupta tüm bakterilerin β -laktamazları yer almış ve ilk kez substrat ve inhibitör özellikler moleküler yapı ile ilişkilendirilmiştir. β -laktamazlar bu sınıflandırmada A, B, C, D olmak üzere dört grupta toplanmaktadır. A, C ve D β -laktam antibiyotiklerin aktif olması için serine ihtiyaç duyduklarından dolayı serin β -laktamazlar olarak adlandırılırlar. Grup B enzimleri ise aktivite için çinkoya gereksinim duyan metallo β -laktamazlardır. β -laktamazların en yeni sınıflandırma şeması 1995 yılında yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasıdır. Bu son sınıflandırma, 1989 yılında Karen Bush'un yaptığı sınıflandırmanın bir uyarlamasıdır ve moleküler sınıflama ile tam olarak uyumaktadır. Enzimler, substrat ve inhibitör profillerine göre gruplandırılmaktadır. Bu sistemde dört kategori ve çok sayıda alt grup bulunmaktadır (64, 69).

Tablo 5: β -laktamazların Sınıflandırılması (38)

Bush-Medeiros-Jacoby Sistemi	Önemli Alt gruplar	Ambler Sistemi	Belli Başlı Özellikler
Grup 1 sefalosporinazlar		C (sefalosporinazlar)	Genellikle kromozomal; karbapenemler dışında tüm β -laktamlara direnç; klavulanat ile inhibisyon yok
Grup 2 penisilinazlar (klavulanik aside duyarlı)	2a	A (serin β -laktamazlar)	Stafilokok penisilinazları
	2b	A	Geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Genişlemiş spektrumlu: çoğunlukla TEM ve SHV çeşitleri
	2br	A	İnhibitörlere dirençli TEM
	2c	A	Karbenisilini hidrolize edenler
	2e	A	Klavulanat ile inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Klavulanat ile inhibe olan karbapenemazlar
	2d	D (oksasilin hidrolizi)	Oksasilini hidroliz edenler (OXA)
Grup 3 metallo β -laktamazlar	3a	B (metalloenzimler)	Çinko bağımlı karbapenemazlar
	3b	B	
	3c	B	
Grup 4 β -laktamazlar		Sınıflanmamış	Birçoğu dizi analizi yapılmamış, çeşitli enzimler

Grup 1 β -laktamazlar: Grup 1 enzimler sefalosporinazlardır ve Ambler sınıflandırma sisteminde C grubunda yer alırlar. Gram negatif bakterilerin birçoğunda kromozom üzerinde kodlanırlar (*Salmonella* ve *Klebsiella* bilinen tek istisna). Kromozomlarda kodlanan enzimler özellikle *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens*'in klinik izolatlarında önemlidir. Grup C β -laktamazlar sefalosporinleri (genişlemiş spektrumlu sefalosporinler dahil) penisilinlerden daha etkin olarak hidroliz ederler. Birçok grup C enzimi klavulonat, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibisyona dirençlidir.

Grup 2 β -laktamazlar: Grup 2 enzimler penisilinazlardır. Bu gruptaki enzimler moleküler sınıf A ve D'yi de içine alan ve plazmidlerle taşınan genler tarafından kodlanırlar. β -laktamazlar arasında en geniş gruba sahiptirler. *Enterobacteriaceae*'da en sık bulunan grup A β -laktamazlar TEM-1 ve SHV-1 olarak tanımlanmıştır. TEM-1 ve SHV-1 β -laktamazlar esas olarak sefalosporinlere karşı azalmış aktivite gösteren penisilinazlardır. Bu iki β -laktamaz ailesi son yirmi yıldır GSBL'nin ve hastanelerde yaygın olan inhibitörlere dirençli TEM β -laktamazların öncüleri olmaları nedeniyle oldukça ilgi görmüşlerdir (38, 69).

Grup 3 β -laktamazlar: Serine bağımlı β -laktamaz enzimlerinden farklı olarak grup 3 enzimler metallo β -laktamazlar (MBL) olarak adlandırılırlar. Bu enzimler kataliz için çinko veya başka bir ağır metale ihtiyaç duyarlar ve EDTA gibi şelat yapan maddeler ile inhibe olurlar. Eskiden MBL esas olarak karbapenemleri hidroliz etme yetenekleriyle ayırt edilebiliyorlardı. Fakat şimdilerde bu yeteneğe sahip bazı serin β -laktamazlar da vardır. Serin β -laktamazların aksine MBL monobaktamlara karşı düşük afiniteye sahiptirler ve klavulonik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilemezler.

Grup 4 β -laktamazlar: Bu grup hakkında yeterli bilgi yoktur. Çünkü bu enzimlerin karakterizasyonu tamamlanmamıştır (38, 69).

2.9. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL), klasik TEM ve SHV tipi β -laktamazların mutant formları olmakla birlikte, orijinal enzimlerin aksine sefamisinler dışındaki tüm sefalosporinleri, aztreonamı ve diğer tüm penisilinleri hidrolize eden enzimlerdir. Aktif bölgelerinde serin içermektedirler. Grup 2b'de yer alan ve penisilin türevleri ile dar

spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları için bu şekilde adlandırılmaktadırlar (70).

GSBL'ler, Ambler'in moleküler sınıflamasında grup A veya grup D içinde, Bush-Jacoby-Medeiros grup 2be ve 2d'de yer almaktadır. GSBL'ler klavulonik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlı iken sefamisinler ve karbapenemlere etki göstermezler. Bu enzimler, 1980'li yılların başında enterik bakterilerde önemli bir direnç mekanizması olarak ortaya çıkmıştır (8, 38).

Çoğu GSBL'nin, enterik gram negatif bakterilerin klasik plazmid kökenli β -laktamazları olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'den köken aldığı bilinmektedir (71). Köken alınan ana enzimin aktif bölgesinin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün, bazı araştırmacılara göre yedi aminoasitin yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL'lerin oluştuğu ileri sürülmektedir. Enzimin yapısında meydana gelen bu değişiklik ile enzimin aktif bölgesi genişlemekte ve oksiminin yan zinciri taşıyan β -laktam antibiyotikleri bu enzimlerin substratı haline getirmektedir. Böylece enzim-substrat ilişkisinin sağlandığı aktif bölgede yeni bir modellenme oluşmakta ve geniş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim) ve aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesi sağlanmaktadır. Yani enzimi kodlayan gen yapısında oluşan değişime bağlı olarak peptid yapısında bazı aminoasit değişikliklerinin meydana gelmesi GSBL'lere farklı substrat özgüllüğü sağlamaktadır. Bu enzimler çoğunlukla bakteri suşları ve türleri arasında yayılabilen büyük plazmidlerde kodlanmaktadır (72, 73).

2.9.1. GSBL Tipleri

Son yıllarda β -laktamazların sayısının arttığı ve klinik açıdan önemli yeni enzim tipleri tanımlandığı görülmektedir. Günümüzde TEM türevi β -laktamazların sayısının 160, SHV türü β -laktamazların ise 100 olduğu bilinmektedir (74). GSBL'ler iki gruba ayrılabilirler:

- TEM ve SHV türevi olan GSBL'ler
- TEM ve SHV dışı GSBL'ler

TEM ve SHV türevi enzimler, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi enzimlerden nokta mutasyonu ile köken almış, GSBL'leri hidrolize edebilen enzimlerdir (75).

2.9.1.1. TEM Grubu Enzimler

TEM-1 enzimi gram negatif bakterilerde en sık bulunan ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten sorumlu olan enzimdir. Bu enzim ilk olarak Yunanistan'da Temoniera adlı bir hastanın kan kültüründen izole edilen *E. coli*'de tespit edilmiştir (8). TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak oksimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur (73). GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1989 yılında bildirilmiştir.

TEM grubu β -laktamazlar, *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *E. aerogenes*, *M.morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır (8).

2.9.1.2. SHV Grubu Enzimler

SHV, sulfhydryl variable'ın kısaltmasıdır. Bu enzimlerin öncüsü olan SHV-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*'de bulunmaktadır ve plazmid kökenli ampisilin direncinin %20'sinden sorumludur. SHV enzimi ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluştururken oksimino sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türevi 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. Sayıları TEM kökenli enzimlerden daha az olmakla birlikte giderek artmaktadır. SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir (8).

2.9.1.3. CTX-M Grubu Enzimler

Son yıllarda GSBL'lerin arasına substrat olarak sefotaksimi tercih eden ve CTX-M olarak tanımlanan yeni bir grup katılmıştır. Seftazidimi az miktarda hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak kadar önemli değildirler. Bu enzimlerin önemli bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulonik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. İlk CTX-M β -laktamaz 1989 yılında Almanya'da *E. coli*'de bildirilmiştir. Bazı plazmid kontrolündeki CTX-M enzimlerinin *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal β -laktamazından köken aldığı bilinmektedir (8, 38, 76, 77). Esas olarak bu enzimler *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *E. coli*'de saptanmıştır fakat *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerinde de gözlemlendiği bilinmektedir. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden

farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella* spp. gibi toplumdaki enfeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (78).

2.9.1.4. OXA Grubu Enzimler

OXA grubu enzimler Ambler grup D, fonksiyonel olarak ise grup 2d'de yer alan enzimlerdir. Oksasilin ve kloksasiline karşı yüksek oranda afinite göstermelerinden dolayı bu ismi almışlardır. Bu enzimler ampisilin ve sefalotine dirençli iken klavulonik asit tarafından inhibisyonları zayıftır. GSBL'lerin çoğu *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerinde bulunmalarına rağmen OXA tipi enzimler esas olarak *P. aeruginosa*'da bulunurlar (8, 79).

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Türkiye'de izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur. Daha sonra OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17 β -laktamazları Türkiye'de izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında tanımlanmıştır. Bu enzimleri kodlayan genlerinin çoğunluğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir (8, 73).

2.9.1.5. İnhibitörlere dirençli (IRT) β -laktamazlar

İnhibitörlere dirençli β -laktamazlar ilk olarak TRC (Klavulonik aside dirençli TEM enzimi), daha sonra TRI (β -laktamaz inhibitörlerine dirençli TEM enzimi) ve en son olarak da IRT (İnhibitörlere dirençli TEM enzimi) olarak isimlendirilmişlerdir.

IRT enzimleri Bush–Jacoby–Medeiros grup 2br'de yer alan enzimlerdir. Bu enzimler dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri, sefamisinleri, karbapenemleri ve piperasilin tazobaktamları hidroliz edememelerine rağmen TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'ler ile ele alınmaktadırlar. Bu enzimler en sık *E. coli*'de bulunmakla birlikte *Klebsiella* spp., *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii* ve *Shigella sonnei*'de de bildirilmişlerdir (80).

2.9.1.6. Diğer GSBL'ler

Son yıllarda GSBL enzimlerinden olup TEM, SHV, OXA veya CTX-M β -laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerden biri PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye'de bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa*

suşunda bulunmuştur. Daha sonra ise *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tespit edilmişlerdir. PER-1 enzimi Türkiye’de oldukça yaygındır ve *A. baumannii*’nin seftazidim dirençli suşlarının %60’ında görülmüşlerdir. Ayrıca plazmidik PER-1 enzimi *Salmonella enterica* serovar Typhimurium’un hastane kaynaklı izolatlarında bulunmuştur. PER-2 enzimi, PER-1 enzimi ile %86 aminoasit homolojisi gösteren diğer bir enzimdir. PER-1 enzimi yalnızca Türkiye’de bulunurken PER-2 enziminin sadece Güney Amerika’da bulunduğu belirtilmiştir (8).

Diğer bir enzim ise VEB-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Vietnam’da bir hastadan izole edilen *E. coli* suşunda daha sonra ise Tayland’da bir *P. aeruginosa* suşundan elde edilmiştir. Başka bir enzim olan CME-1 enzimi bir *Chryseobacterium meningosepticum* suşundan, TLA-1 enzimi ise Meksika’da bir hastadan izole edilen *E. coli* suşundan elde edilmiştir. PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1 ve TLA-1 enzimleri birbirleriyle %50 homoloji göstermektedirler ve oksiminio sefalosporinlere özellikle seftazidime ve aztreonama etkilidirler (8).

Diğer bir enzim olan SFO-1 enzimi, *Serratia fonticola*’daki sınıf A β -laktamazdır. İlk kez 1988’de Japonya’da *E. cloacae* izolatında bulunmuştur. Çok nadir görülen bir enzimdir. Bu enzim sefotaksimi iyi, seftazidimi kötü, sefamisin ve karbapenemi zayıf bir şekilde hidroliz ederken klavulonat ve imipenem tarafından inhibe edilemezler.

BES-1 enzimi 1996’da Brezilya’da bir hastanede *Serratia marcescens* suşundan izole edilmiştir. Aztreonama yüksek seviyede direnç varken sefotaksime, seftazidimden daha dirençlidirler. *bla*_{BES-1} geni plazmid tarafından kodlanır ve fonsiyonel grup 2be’de yer alır. CTX-M grup 1 β -laktamaz ile %48 oranında aminoasit benzerliği vardır. Klavulonat tarafından iyi bir şekilde inhibe edilirken tazobaktam ile inhibisyon zayıftır.

BEL-1 enzimi 2004’de Belçika’da bir *P. aeruginosa* suşundan izole edilmiştir. Bu enzim diğer Ambler sınıf A GSBL’ler ile az oranda ilişkilidirler. GES-1 ile %50, CTX-M grup 8 ile %40 ve BES-1 ile %36 oranında aminoasit benzerliği vardır. BEL-1 enzimi çoğu geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz ederler ve klavulonat, sefoksitin, moksalaktam ve imipenem tarafından inhibe edilirler.

GES enzimi diğer bir nadir görülen GSBL’lerdendir. *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*’da saptanmıştır. GES-1 enzimi ilk kez Fransa’da bir *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır ve bu enzimin plazmid ve integron tarafından kodlandığı bildirilmiştir. GES

enzimi penisilinler ve geniş spektrumlu sefalosporinlere etkili iken sefamisin ve karbapenemlere etkili değildirler. Klavulonat, tazobaktam ve imipenem tarafından inhibe edilmelerine rağmen aztreonam tarafından hidroliz edilemezler (8).

2.10. GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı

GSBL üreten bir mikroorganizma ile enfekte olan hastalarda geniş spektrumlu bir β -laktam ile tedavi risklidir. GSBL ürettiği saptanan bir bakteri, antibiyotik duyarlılık test sonucu ne olursa olsun, sefamisinler dışında tüm geniş spektrumlu β -laktam antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmelidir (81).

2.10.1. GSBL Tarama Testleri

Amerika'nın Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır (81).

Tablo 6: GSBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon Zonu ve MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) Değerleri (82)

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK ($\mu\text{g/ml}$)
Sefotaksim (CTX)	≤ 14	≥ 64
Seftriakson (CRO)	≤ 14	≥ 64
Seftazidim (CAZ)	≤ 14	≥ 32
Sefpodoksime (CPD)	≤ 17	≥ 8
Aztreonam (ATM)	≤ 15	≥ 32

2.10.2. GSBL Saptama ve Doğrulama Testleri

Doğrulama testleri klavulonik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler; kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, üç boyutlu test, otomatize sistemler (Vitek, MicroScan, BD Phoenix) ve moleküler tekniklerdir (PCR, DNA problrarı, Nükleotid sekanslama) (8, 70).

2.10.2.1. Kombine Disk Yöntemi

Kombine disk yönteminde sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerine 10 µg klavulonik asit eklenir. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı mueller-hinton agar (MHA) plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 37°C'lik inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir. Kombinasyon diski olarak 1 mg klavulonik asit içeren sefpodoksim (10 µg) diskleri de kullanılabilir (83, 84).

2.10.2.2. Çift Disk Sinerji Testi

Disk difüzyon yöntemine dayanır. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanır ve MHA plağına yayılır. Merkeze amoksisilin-klavulonik asit diski (AMC 10+20µg) yerleştirilir. Merkezden merkeze uzaklığı 20–25 mm olacak şekilde aztreonam (AZT 30µg), seftazidim (CAZ 30µg), sefotaksim (CTX 30µg) diskleri konulur. 37°C'de 18–20 saat inkübe edilir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik aside doğru genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasında bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bölge görülmesi GSBL pozitif olarak yorumlanır. Ancak bu yöntem kullanılırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Öncelikle enzim substrat profili değişik olduğu için antibiyogramlarda indikatör antibiyotiklerin hemen hepsinin yer alması önerilmektedir. CLSI önerilerine göre; CAZ, CTX veya CRO zon çapı 14 mm ve altındaysa, ATM zon çapı 15 mm ve altındaysa, CRO zon çapı 25 mm ve altındaysa, CPD zon çapı 17 mm ve altındaysa kesinlikle GSBL için doğrulama testi yapılmalıdır.

2.10.2.3. E-Test Yöntemi

Ticari olarak bir ucunda seftazidim (CAZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit (CAZ/CLA) içerecek şekilde test stripleri hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. CAZ ve CAZ/CLA MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim (CTX) ve sefotaksim-klavulanik asit (CTX/CLA) içeren E-Test stripleri de

bulunmaktadır. Özellikle CTX/CLA striplerinde klavulanik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (85, 86).

2.10.2.4. Sıvı (Broth) Mikrodilüsyon Yöntemi

Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit (4 µg/ml) varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 8 kat ve üzeri azalma olması GSBL göstergesi olarak kabul edilir (85).

2.10.2.5. Üç Boyutlu Test

Direkt veya indirekt uygulanabilir. Hazırlanan 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu MHA yüzeyine sürülür. Petrinin ortasına yakın tarafta ve kullanılan antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire şeklinde kesilir. Oluşan besiyeri çizgisinin içine test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile doldurulur. Her iki inokulasyon yapıldıktan sonra seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam diskleri yerleştirilir. Bu disklere ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma, kesintiye uğrama veya bakterinin inoküle edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi; antibiyotiğin yoğun inokülasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini gösterir ve GSBL pozitif olarak değerlendirilir (83, 84).

2.10.2.6. Otomatize Sistemler

Otomatize mikrobiyoloji sistemleri, mikroorganizmaların zaman ve iş gücü kaybı yaşanmadan, standardize bir dizi protokol uygulandıktan sonra, bazı firmalar (Becton Dickinson Diagnostics-USA, Dade Behring Inc-USA, bioMérieux-France gibi) tarafından üretilen medikal cihazlar ile bazı spektrofotometrik veya başka bir dizi ölçüm yöntemi kullanılarak tiplendirilmesini ve bazı sistemlerde, tek bir işlemde tiplendirilmenin yanı sıra ilaç dirençlilik profillerini de görüntülemek için kullanılan sistemlerdir. Uygulama üretici firma önerilerine göre yapılmaktadır (84).

2.10.2.7. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler enzimlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA problemleri ile hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu [Polimerase Chain Reaction (PCR)], oligotiplendirme, ligaz zincir reaksiyonu, izoelektrik fokuslama ve nükleik asit dizi analizi

dirençte rol oynayan enzimlerin moleküler tanımlanmasında yer alan yöntemlerdir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Enzimin kesin olarak tanımlanması altın standart yöntem olarak kabul edilen nükleik asit dizi analizi ile mümkün olmaktadır. Ayrıca yeni enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir.

Fenotipik metotlara göre özgülüğü oldukça yüksek olan genotipik yöntemlerle sadece GSBL üretimi değil üretilen enzimin genotipi de belirlenebilmektedir (74, 87).

2.10.2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kary Mullis tarafından bulunan PCR, nükleik asitlerin invitro olarak çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir (79). Hücre içinde DNA replikasyonu için birçok protein görev yapar. DNA'nın yüksek ısıya dayanıklı bir molekül olması nedeniyle replikasyonda görev alan birçok proteinin yerine ısı gibi fiziksel etmenler kullanılır. Örneğin replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması, ortamın 94°C'ye kadar ısıtılması ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasıyla sağlanır. Oysa 37°C de yaşamını sürdüren bir hücre denatürasyon adımı verdiğimiz zincir ayrılmasını, bu sıcaklıkta başarmak zorundadır. Bu nedenle "tek zincir bağlayan protein" gibi yardımcı proteinlere gereksinim duyar. Hücre içinde replikasyonun başlamasında bir başka önemli olay "primaz" denen enzim tarafından genellikle 12 nükleotid uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yapar. PCR da ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgür olarak bağlanan primerler tepkime karışımının içerisine önceden konur (88, 89).

PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında şu maddeler yer almalıdır: Çoğaltılacak olan kalıp DNA, bu DNA da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerleri, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP), DNA polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler, tuzlar ve enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları (88, 89, 90, 91).

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyon aşamasıdır. 94°C ye kadar ısıtılan DNA'nın iki

zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak annealing aşamasıdır. Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler, çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül nükleotid dizilerini tanıyarak hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Primerlerin bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50 ile 70°C arasında değişir. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3' ucuna kalıp DNA ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur. Bu döngünün her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Çoğaltılan DNA parçaları birçok değişik yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır. Daha sonra DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında görüntülenir. Elektroforez sırasında bir DNA molekül ağırlık standardı kullanılır ve PCR ürünlerinin büyüklüğü, bu DNA molekül ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlenir (90).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Klinik Bakteri İzolatları

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na 18 Mayıs 2010 ile 31 Ağustos 2010 tarihleri arasında gönderilen 5057 idrar örneğinden izole edilmiş, Phoenix otomatize sistemde GSBL ürettiği belirlenmiş prospektif olarak toplanan 119 *E. coli*, 22 *K. pneumoniae* ve 3 *K. oxytoca*'dan oluşan toplam 144 izolat çalışmaya dahil edildi. İzolatlar tek koloni pasajı yapılarak kanlı agarda üretildikten sonra %20 gliserol içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri içinde -80°C'de saklandı. Bakteri izolatlarının türü, izole edildiği tarih, materyalin geldiği hastane birimi, izolasyon tarihi ve izolat kodu Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: İzole Edilen GSBL Pozitif Bakteri Türleri

NO	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	İzolasyon Tarihi	Materyalin Geldiği Birim
1	EC001	<i>Escherichia coli</i>	18.05.2010	Üroloji Servisi
2	EC002	<i>Escherichia coli</i>	18.05.2010	Üroloji Servisi
3	KO003	<i>Klebsiella oxytoca</i>	17.05.2010	Üroloji Polikliniği
4	KP004	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20.05.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
5	EC005	<i>Escherichia coli</i>	21.05.2010	Dahiliye-Gastroenteroloji Srv.
6	EC006	<i>Escherichia coli</i>	20.05.2010	Yenidoğan Yoğun Bakım Plk.
7	EC007	<i>Escherichia coli</i>	21.05.2010	Kadın Doğum Servisi
8	EC008	<i>Escherichia coli</i>	21.05.2010	Yanık Ünitesi
9	EC009	<i>Escherichia coli</i>	20.05.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
10	EC010	<i>Escherichia coli</i>	20.05.2010	Üroloji Polikliniği
11	EC012	<i>Escherichia coli</i>	24.05.2010	Kadın Doğum Polikliniği
12	KP013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.05.2010	Gastroenteroloji Polikliniği
13	EC014	<i>Escherichia coli</i>	25.05.2010	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği
14	EC016	<i>Escherichia coli</i>	24.05.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
15	EC017	<i>Escherichia coli</i>	25.05.2010	Üroloji Polikliniği
16	EC018	<i>Escherichia coli</i>	25.05.2010	Fizik Tedavi Servisi
17	EC021	<i>Escherichia coli</i>	27.05.2010	Üroloji Servisi
18	EC023	<i>Escherichia coli</i>	26.05.2010	Üroloji Servisi
19	EC024	<i>Escherichia coli</i>	26.05.2010	Pediyatri-Endokrin Polikliniği
20	KP025	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.05.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
21	EC026	<i>Escherichia coli</i>	25.05.2010	Nöroloji Servisi
22	EC027	<i>Escherichia coli</i>	28.05.2010	Endokrin Polikliniği
23	EC028	<i>Escherichia coli</i>	28.05.2010	Pediyatrik Nefroloji Poliklinik
24	EC029	<i>Escherichia coli</i>	27.05.2010	Pediyatrik Nefroloji Poliklinik
25	EC031	<i>Escherichia coli</i>	29.05.2010	Pediyatri-Süt Çocuğu Servisi
26	EC032	<i>Escherichia coli</i>	30.05.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
27	EC033	<i>Escherichia coli</i>	31.05.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
28	EC035	<i>Escherichia coli</i>	01.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
29	EC037	<i>Escherichia coli</i>	03.06.2010	Pediyatrik Cerrahi Plk.
30	EC038	<i>Escherichia coli</i>	03.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
31	KP039	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03.06.2010	Dahiliye-Onkoloji 2 Servisi
32	KP040	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.05.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
33	EC041	<i>Escherichia coli</i>	06.06.2010	Yanık Ünitesi
34	EC042	<i>Escherichia coli</i>	07.06.2010	Pediyatri-Adölsan Servisi
35	EC043	<i>Escherichia coli</i>	06.06.2010	Nöroşirurji Yoğun Bakım
36	EC044	<i>Escherichia coli</i>	07.06.2010	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği
37	EC047	<i>Escherichia coli</i>	11.06.2010	Pediyatri-Göğüs ve Alerji Plk.
38	EC048	<i>Escherichia coli</i>	09.06.2010	Enfeksiyon Servisi
39	EC049	<i>Escherichia coli</i>	10.06.2010	Nöroloji Servisi
40	KP050	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.06.2010	Genel Cerrahi Servisi
41	KP052	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.06.2010	Dahiliye Servisi-1
42	EC055	<i>Escherichia coli</i>	15.06.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
43	EC057	<i>Escherichia coli</i>	14.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
44	EC059	<i>Escherichia coli</i>	16.06.2010	Endokrin Polikliniği

NO	İzolasyon Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	İzolasyon Tarihi	Materyalin Geldiği Birim
45	KP060	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.06.2010	Nöroloji Servisi
46	EC061	<i>Escherichia coli</i>	18.06.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
47	EC064	<i>Escherichia coli</i>	21.06.2010	Üroloji Polikliniği
48	EC065	<i>Escherichia coli</i>	21.06.2010	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği
49	EC067	<i>Escherichia coli</i>	22.06.2010	Acil Polikliniği
50	EC068	<i>Escherichia coli</i>	22.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
51	EC069	<i>Escherichia coli</i>	23.06.2010	Dahiliye-Endokrin Servisi
52	KP070	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.06.2010	Göğüs Hastalıkları Servisi
53	KP071	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
54	EC072	<i>Escherichia coli</i>	25.06.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
55	EC073	<i>Escherichia coli</i>	24.06.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
56	EC075	<i>Escherichia coli</i>	24.06.2010	Enfeksiyon Polikliniği
57	EC076	<i>Escherichia coli</i>	28.06.2010	Üroloji Polikliniği
58	EC077	<i>Escherichia coli</i>	26.06.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
59	EC078	<i>Escherichia coli</i>	28.06.2010	Enfeksiyon Polikliniği
60	EC084	<i>Escherichia coli</i>	29.06.2010	Yenidoğan Yoğun Bakım 2 Servisi
61	EC085	<i>Escherichia coli</i>	29.06.2010	Üroloji Polikliniği
62	EC086	<i>Escherichia coli</i>	01.07.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
63	EC088	<i>Escherichia coli</i>	01.07.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
64	EC089	<i>Escherichia coli</i>	06.07.2010	Göğüs Hastalıkları Servisi
65	EC090	<i>Escherichia coli</i>	05.07.2010	Üroloji Polikliniği
66	EC091	<i>Escherichia coli</i>	06.07.2010	Yenidoğan Yoğun Bakım Polikliniği
67	EC092	<i>Escherichia coli</i>	06.07.2010	Pediyatri-Adölsan Servisi
68	EC095	<i>Escherichia coli</i>	07.07.2010	Dahiliye-Endokrin Servisi
69	KP097	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09.07.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
70	EC098	<i>Escherichia coli</i>	10.07.2010	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
71	EC099	<i>Escherichia coli</i>	12.07.2010	Anestezi Yoğun Bakım BD. Servisi
72	EC100	<i>Escherichia coli</i>	12.07.2010	Dahiliye-Endokrin Servisi
73	EC101	<i>Escherichia coli</i>	12.07.2010	Enfeksiyon Polikliniği
74	EC102	<i>Escherichia coli</i>	13.07.2010	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
75	EC103	<i>Escherichia coli</i>	17.07.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
76	EC104	<i>Escherichia coli</i>	19.07.2010	Nefroloji Polikliniği
77	EC105	<i>Escherichia coli</i>	19.07.2010	Üroloji Servisi
78	EC106	<i>Escherichia coli</i>	14.07.2010	Üroloji Servisi
79	EC107	<i>Escherichia coli</i>	16.07.2010	Üroloji Polikliniği
80	EC109	<i>Escherichia coli</i>	26.07.2010	Acil Poliklinik
81	EC113	<i>Escherichia coli</i>	13.07.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
82	KP114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14.07.2010	Genel Cerrahi Servisi
83	EC115	<i>Escherichia coli</i>	20.07.2010	Pediyatri Acil Polikliniği
84	EC116	<i>Escherichia coli</i>	19.07.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
85	EC118	<i>Escherichia coli</i>	18.07.2010	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
86	EC123	<i>Escherichia coli</i>	21.07.2010	Pediyatrik Cerrahi Polikliniği
87	EC124	<i>Escherichia coli</i>	16.07.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
88	EC130	<i>Escherichia coli</i>	29.07.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
89	EC132	<i>Escherichia coli</i>	30.07.2010	Genel Cerrahi Servisi
90	EC133	<i>Escherichia coli</i>	02.08.2010	Nöroloji Polikliniği
91	EC134	<i>Escherichia coli</i>	02.08.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
92	EC136	<i>Escherichia coli</i>	29.07.2010	Acil Poliklinik
93	EC137	<i>Escherichia coli</i>	06.08.2010	Beyin Cerrahi Polikliniği
94	EC140	<i>Escherichia coli</i>	04.08.2010	Nöroloji Servisi
95	EC141	<i>Escherichia coli</i>	06.08.2010	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
96	EC142	<i>Escherichia coli</i>	04.08.2010	Kadın Doğum Polikliniği
97	EC149	<i>Escherichia coli</i>	03.08.2010	Hematoloji Polikliniği
98	EC150	<i>Escherichia coli</i>	05.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi

NO	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	İzolasyon Tarihi	Materyalin Geldiği Birim
99	EC151	<i>Escherichia coli</i>	09.08.2010	Pedatri Yoğun Bakım Servisi
100	EC152	<i>Escherichia coli</i>	06.08.2010	Enfeksiyon Polikliniği
101	EC153	<i>Escherichia coli</i>	10.08.2010	Üroloji Polikliniği
102	EC154	<i>Escherichia coli</i>	09.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
103	EC155	<i>Escherichia coli</i>	02.08.2010	Gastroenteroloji Polikliniği
104	EC156	<i>Escherichia coli</i>	07.08.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
105	EC157	<i>Escherichia coli</i>	09.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
106	KO158	<i>Klebsiella oxytoca</i>	09.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
107	EC159	<i>Escherichia coli</i>	10.08.2010	Pedatri-Adölsan Servisi
108	EC160	<i>Escherichia coli</i>	09.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
109	EC161	<i>Escherichia coli</i>	10.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
110	KP162	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.08.2010	Dahiliye Polikliniği
111	EC163	<i>Escherichia coli</i>	11.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
112	EC164	<i>Escherichia coli</i>	10.08.2010	Pedatri Acil Servisi
113	EC166	<i>Escherichia coli</i>	13.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
114	EC167	<i>Escherichia coli</i>	11.08.2010	Pedatrik Cerrahi Polikliniği
115	KP168	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
116	KP169	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04.08.2010	Pedatri Acil Polikliniği
117	KP170	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
118	EC171	<i>Escherichia coli</i>	16.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
119	EC173	<i>Escherichia coli</i>	12.08.2010	Dahiliye-Nefroloji Servisi
120	EC174	<i>Escherichia coli</i>	15.08.2010	Kardiyovasküler
121	EC177	<i>Escherichia coli</i>	14.08.2010	Radyasyon Onkolojisi Polikliniği
122	EC178	<i>Escherichia coli</i>	16.08.2010	Kardiyoloji Servisi
123	KP179	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16.08.2010	Pedatri-Hematoloji Servisi
124	EC180	<i>Escherichia coli</i>	16.08.2010	Pedatri-Hematoloji Servisi
125	EC181	<i>Escherichia coli</i>	17.08.2010	Enfeksiyon Polikliniği
126	EC183	<i>Escherichia coli</i>	19.08.2010	Nefroloji Polikliniği
127	EC184	<i>Escherichia coli</i>	18.08.2010	Kardiyoloji Servisi
128	EC185	<i>Escherichia coli</i>	17.08.2010	Pedatri-Kardiyoloji Polikliniği
129	EC188	<i>Escherichia coli</i>	19.08.2010	Enfeksiyon Polikliniği
130	EC189	<i>Escherichia coli</i>	17.08.2010	Fizik Tedavi Polikliniği
131	EC190	<i>Escherichia coli</i>	27.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
132	KP191	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.08.2010	Anestezi Yoğun Bakım BD.Servisi
133	EC192	<i>Escherichia coli</i>	23.08.2010	Dahiliye Servisi-1
134	KP193	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.08.2010	Dahiliye Servisi-1
135	KP195	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
136	KP196	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
137	KO199	<i>Klebsiella oxytoca</i>	23.08.2010	Pedatri Enfeksiyon Servisi
138	EC202	<i>Escherichia coli</i>	18.08.2010	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
139	EC204	<i>Escherichia coli</i>	25.08.2010	Pedatrik Nefroloji Poliklinik
140	KP205	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.08.2010	Beyin Cerrahi Servisi
141	EC206	<i>Escherichia coli</i>	27.08.2010	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi
142	EC207	<i>Escherichia coli</i>	25.08.2010	Pedatri Yoğun Bakım Servisi
143	EC208	<i>Escherichia coli</i>	24.08.2010	Dahiliye-Onkoloji Servisi
144	EC216	<i>Escherichia coli</i>	31.08.2010	Genel Cerrahi Polikliniği

*EC; *Escherichia coli*, KP; *Klebsiella pneumoniae*, KO; *Klebsiella oxytoca*

3.1.2. Araç ve Gereçler

1.5 ml'lik santrifüj tüpleri ve 0.2 ml'lik PCR tüpleri (grainer bio-one), çalkalayıcı su banyosu (GFL 1086, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazı, CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA), pastör fırını (Hanna, Portekiz), manyetik karıştırıcı (Stuart), otomatik pipetler (Lab-mate), pipet ucu, vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Sigma), elektroforez tankı (Owl), dijital güç kaynağı (EC-105), jel dökme tepsisi ve tarak, 250 ml erlenmayer, 50 ml mezür, etüv (Dedeoğlu), otoklav (Kermanlar), back alevi, kaynatma kabı, buz makinesi (Scotsman), thermal cycler (ABI 9700, Applied biosystems), hassas terazi (Sartorius Laboratory), mikrodalga fırın (Beko), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad), UV ilüminatör (Vilber lourmat), -20°C (Uğur), -80°C (Thermo) derin dondurucular, deiyonize su cihazı (Barnstead) ve distile su cihazı (GFL).

3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler değişik firmalardan sağlandı. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Almanya), Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon, AST indikatörü, Bacto Tryptone, Sodium hydroxid (NaOH), Yeast Extract, Luria Bertani (LB) Broth (Merck), Tryptose Blood Agar (Merck), Agaroz (Quantum Biotechnologies), Etidyum bromür (Sigma), Bromphenol blue, Xylene cyanol, Tris HCl, EDTA, Glycerol, double distile water (ddw), Enjeksiyonluk su, Amplifikasyon seti; dNTP seti (Roche, Almanya, Fermentas, ABD), Primerler (IDT, Amerika, biomers, Almanya), PCR master mix (Promega, Amerika), 1 kb DNA marker (Fermentas), 100 bp DNA marker (Biolabs, New England).

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1.1. Tris HCl (1 M): 80 ml distile su üzerine 15.7 gr Tris HCl eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.1.2. EDTA (0.5 M): 80 ml distile su üzerine 29.2 gr EDTA eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildi.

3.1.4.1.3. TE Tamponu: Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1ml, EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98.8 ml distile suya eklendi.

3.1.4.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.2.1. dNTP Mix: 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 100 mM'luk dTTP, dATP, dGTP, dCTP'den 20'şer µl koyuldu ve üzerine 720 µl steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir süre vortekslendi. Böylece 2.5 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım 200'er µl olarak yeni, steril, DNase-free santrifüj tüplerine bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.2.2. Primer Mix: Liyofilize haldeki primerler 100 pmol/µl olacak şekilde steril distile suyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edilmiştir. Her bir primer çifti için, 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine stok çözeltilerden 20'şer µl koyuldu ve üzerine 360 µl steril distile su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/µl olan (her biri) primer mix hazırlandı. Kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.3.1. 5XTBE Tamponu: 54 gr Tris Base, 27.5 gr Boric Acid ve 3.72 gr EDTA az miktarda distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldükten sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

3.1.4.3.2. Yükleme Tamponu (Loading Buffer): 30 ml gliserol, 250 mg bromphenol blue ve 250 mg xylene cyanol distile su içinde karıştırıldı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 1'er ml olarak dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.4.3.3. Etidyum Bromür Solüsyonu: Etidyum bromür 10 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü ve oda ısısında ışıktan korunarak saklandı.

3.2. METOD

3.2.1. Bakterilerin İdentifikasyonu ve Antibiyotik Direnç Paternlerinin Belirlenmesi

K.T.Ü Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na gelen idrar örneklerinin kanlı ve EMB agara ekimleri yapıldı. EMB agarda pembe-kırmızı, metalik röfle yapan, kanlı agarda düzgün 2-3 mm çapında laktoz pozitif *E. coli* olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden ve EMB agarda 3-4 mm çapında pembe mukoid, kanlı agarda mukoid 3-4 mm çapında laktoz pozitif Klebsiella olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif basil olduğu belirlenen kolonilere oksidaz testi yapıldı. *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğundan şüphelenilen oksidaz negatif, gram negatif basillere ait kolonilerden CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, USA) kullanılarak ID buyyon içerisinde 0.5 McFarland standardına ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlandı. Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon tüpüne, bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde, 25 µl bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra AST buyyon içerisine bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. Hazırlanan paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20 dakikada bir okuma yapan Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) cihazına yerleştirildi ve Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) otomatize mikrobiyoloji sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Suşlar Phoenix ID/AST otomatize mikrobiyoloji sisteminde (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Suşların antibiyotik duyarlılıkları UNMIC/ID-83 panellerinin kullanıldığı BD Phoenix sistemine (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) göre yapıldı. Bu sistemde bakterilerin tipi, antibiyogram sonuçları ve GSBL yorumu elde edildi. Duyarlılık testlerinin sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (82).

3.2.2. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kaynatma metodu ile DNA açığa çıkarıldı. Öncelikle -20°C'de saklanan bakteriler çıkartıldı ve kanlı besiyerine ekimleri yapıldı. Plaklardan tek koloni alınıp 3 ml'lik LB sıvı besiyerine bakteriler ekildi ve 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm'de bir gece inkübe edildi. Kültürün 1.5 ml'si steril eppendorf tüplere transfer edilerek

mikrosantrifüjde 5000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Süpernatant kısmı döküldü ve pelletin üzerine 1ml TE tamponu eklenip vortekslendi. Tekrar 5000 rpm'de 5dk çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant kısmı döküldü ve pelletin üzerine 1ml ddw eklenip vortekslendi. Santrifüj işlemi aynı koşullarda bir kez daha tekrarlanıp süpernatant kısmı döküldükten sonra pelletin üzerine bu kez 500 µl ddw eklendi ve bakteri süspansiyonu 95°C'de 10 dk kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm'de 5dk çöktürüldü. Süpernatant kısmından 400 µl alınıp steril bir eppendorf tüpe koyuldu. Çalışma yapılmaya kadar -20°C'de bekletildi.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction (PCR))

Çalışmamızda, idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarından kaynatma metodu ile elde edilen DNA'lar kullanıldı.

GSBL pozitifliğine neden olan β-laktamaz enzim direncini kodlayan genler arasından en yaygınları olan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerinin varlığı geleneksel PCR yöntemi ile araştırıldı (10). Ayrıca β-laktam direncinin yayılımında rol alan elementlerden integronlara ait korunmuş bölgelerden faydalanılarak çalışma grubunun integron içeriği aynı yöntemle incelendi (10).

Her test en az iki kere tekrarlandı.

3.2.3.1. Direnç Genlerinin Araştırılması

Primerlerin tüm alt tipleri tanıyabilmesi için *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerinin korunmuş bölgelerine özgül primerler kullanıldı. Amplifikasyon için Tablo 8'de verilen primerler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak daha önceden bu genleri içerdiği bilinen *E. coli* suşları kullanıldı (pMON 300; OXA-1, RP4; TEM-2, TRE40; SHV ve CTX-M için sekans analizi yapılmış ve bu geni içerdiği bilinen *Salmonella* izolatı kullanıldı).

Tablo 8: β -laktamaz Enzim Direncini Kodlayan Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp*)	Referans
TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	867	10
TEM-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA		
SHV-F	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	626	92
SHV-R	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		
CTX-MF	CGCTTTGCGATGTGCAG	550	93
CTX-MR	ACCGCGATATCGTTGGT		
OXA-F	ACACAATACATATCAACTTCGC	885	10
OXA-R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		

*bp: Baz pair

3.2.3.2. İntegraz ve İntegron Genlerinin Araştırılması

GSBL direncine sahip olduğu fenotipik olarak gösterilen suşlarda integraz 1 ve 2 varlığının ve integraz saptanan suşlarda integronların araştırılması amacıyla Tablo 9'da belirtilen primerler kullanıldı.

Tablo 9: İntegraz ve İntegronların Araştırılmasında Kullanılan Primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp*)	Referans
IntI-1F	GGTCAAGGATCTGGATTTGG	500	10
IntI-1R	ACATGCGTGTAATCATCGTC		
IntI-2F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	740	10
IntI-2R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	-	10
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA		
hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	-	10
hep74	CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA		

*bp: Baz pair

3.2.4. Master Mix Hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10: PCR İçin Master mix Bileşenleri ve Miktarları

Komponent	Stok Konsantrasyonu	Miktar (1x) μl
Buffer	5X	10
dNTP mix	2.5 mM	1
MgCl ₂	25 mM	5
Primer 1	5 pmol	1.5
Primer 2	5 pmol	1.5
Taq polimeraz	5 U/ μ l	0.3
ddw		25.7
Template		5
Toplam hacim		50

Master mix hazırlamak için öncelikle bir kutu içerisine bir miktar buz koyuldu. Buz üzerine 1.5ml santrifüj tüpü yerleştirildi. Yukarıdaki tabloda gösterilen kimyasallar -20°C'de ki dondurucudan çıkartıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkartıldı. Çözünen kimyasallar biraz vortekslendikten sonra Tablo 10'da belirtilen sıraya göre karıştırıldı. Taq polimeraz kullanılmadan önce kısa bir santrifüj edildi ve yukarı/aşağı pipetleyerek tüpe aktarıldı. Deiyonize su konulduktan sonra tüp 30sn vortekslenerek master mix karıştırıldı. Bu işlemler sonunda master mix hazırlanmış oldu. Hazırlanan master mix 0.2ml'lik PCR tüplerine 45'er μ l olarak pipetlendi. Tüplerin üzerlerine örnek numaraları yazıldı ve numaralarına göre izole edilen DNA'lardan her bir tüpe 5'er μ l yüklendi. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da daha önceden β -laktamaz geni bulundurduğu bilinen *E. coli* suşlarından izole edilen DNA örneğinden 5 μ l eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler thermal döngü cihazına yerleştirildi.

3.2.5. Amplifikasyon

3.2.5.1. *bla*_{TEM} Geninin Amplifikasyonu

*bla*_{TEM} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 867 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan TEM-F ve TEM-R primerleri kullanıldı (Tablo 8). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *bla*_{TEM} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	96	5	1
Denatürasyon	96	1	35
Bağlanma	58	1	
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	
Bekleme	4	∞	1

3.2.5.2. *bla*_{SHV} Geninin Amplifikasyonu

*bla*_{SHV} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 626 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan SHV-F ve SHV-R primerleri kullanıldı (Tablo 8). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *bla*_{SHV} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	94	10	1
Denatürasyon	94	2	26
Bağlanma	60	1	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	2	
Bekleme	4	∞	1

3.2.5.3. *bla*_{CTX-M} Geninin Amplifikasyonu

*bla*_{CTX-M} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 550 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan CTX-MA ve CTX-MB primerleri kullanıldı (Tablo 8). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *bla*_{CTX-M} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	96	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	54	1	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	1
Bekleme	4	∞	

3.2.5.4. *bla*_{OXA} Geninin Amplifikasyonu

*bla*_{OXA} geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 885 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan OXA-F ve OXA-R primerleri kullanıldı (Tablo 8). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *bla*_{OXA} geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	96	5	1
Denatürasyon	96	1	35
Bağlanma	60	1	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	1
Bekleme	4	∞	

3.2.5.5. *intI-1* Geninin Amplifikasyonu

intI-1 geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 500 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan IntI1-F ve IntI1-R primerleri kullanıldı (Tablo 9). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *intI-1* geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	94	12	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	59	45 s	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	
Bekleme	4	∞	1

3.2.5.6. *intI-2* Geninin Amplifikasyonu

intI-2 geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 740 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan IntI2-F ve IntI2-R primerleri kullanıldı (Tablo 9). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek *intI-2* geni varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	94	12	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	59	45 s	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	
Bekleme	4	∞	1

3.2.5.7. Sınıf 1 İntegron Amplifikasyon

Sınıf 1 integron varlığını PCR ile göstermek için Lèvesque ve ark. tarafından rapor edilen yöntem kullanıldı (94). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnek Sınıf 1 integron varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	30 s	30
Bağlanma	55	30 s	
Uzama	70	3	
Son uzama	70	7	1
Bekleme	4	∞	

3.2.5.8. Sınıf 2 İntegron Amplifikasyon

Sınıf 2 integron varlığını PCR ile göstermek için hep51 ve hep74 primerleri kullanıldı (Tablo 9). DNA ekstraksiyonu yapılan toplam 144 örnekten, *intI-2* geni pozitif çıkan 8 örnek Sınıf 2 integron varlığı bakımından değerlendirildi. Amplifikasyon için hazırlanan PCR karışımı daha önce anlatıldığı gibi hazırlanarak termal döngü cihazına yerleştirildi. PCR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Siklus sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	30 s	30
Bağlanma	55	30 s	
Uzama	70	3	
Son uzama	70	7	1
Bekleme	4	∞	

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Amplifiye edilen ürünlerin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı. Elektroforez için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1 gr agaroz 50 ml TBE tamponu ile karıştırılmış ve mikrodalga fırın içerisinde partikülleri tamamen eriyinceye kadar ısıtılmıştır. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra içine son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve dağılması için çalkalandı. Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu ve jel tepsiye döküldükten sonra katılaşması için oda ısısına bırakıldı. Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra tepsi ile birlikte elektroforez tankının içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA'yı ağırlaştırarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA'nın yaklaşık konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µl PCR ürünü 3 µl yükleme tamponuna karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Örnekler ilk 10 dk 80 voltta yürütüldükten sonra volt 100'e çıkarılıp 30 dk daha yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV ilüminatörde jel incelendi.

4. BULGULAR

4.1. Örnekler

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakterioloji Birimi'ne 18 Mayıs 2010 ile 31 Ağustos 2010 tarihleri arasında kabul edilen idrar örneklerinden yapılan aerob kültürlerde üreyen ve etken olarak rapor edilen izolatlar arasından pasajlanan GSBL pozitif 119 *E. coli* ve 25 *Klebsiella* spp. izolatı çalışmada kullanıldı (Tablo 11). Aynı hastadan antibiyotik direnç paterni aynı olan ve aynı tür izolatlardan yalnız ilk izolat çalışmaya dahil edildi.

Tablo 11: İYE Etkeni *E. coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında GSBL Varlığı

İzolat (Toplam)	Köken		GSBL pozitifliği	
	Poliklinik (%)	Servis (%)	Poliklinik (%)	Servis (%)
<i>E. coli</i> (541)	461 (85.2)	80 (14.8)	75 (16.3)	67 (83.8)
<i>K. pneumoniae</i> (99)	60 (60.6)	39 (39.4)	9 (15)	13 (33.3)
<i>K. oxytoca</i> (21)	12 (57.1)	9 (42.9)	0	4 (44.4)
<i>Klebsiella</i> spp. (17)	12 (70.6)	5 (29.4)	-	-
TOPLAM (678)	545	133	84	84

Belirtilen dönemde toplam 168 GSBL pozitif izolattan pozitif ve tekli olarak izole edilen 144 izolat çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen, identifikasyonu ve antibiyotik direnç testleri BD Phoenix Otomatize Mikrobiyoloji Sistem'inde yapılan ve aynı cihazda GSBL pozitif olarak yorumlanan toplam 119 *E. coli* ve 25 *Klebsiella* spp. izolatının dağılımı Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12: Çalışmaya Dahil Edilen ve GSBL Üreten İzolatların Dağılımı

İzolat (Toplam)	Köken	
	Poliklinik n(%)	Servis n(%)
<i>E. coli</i> (119)	67 (56.3)	52 (43.7)
<i>K. pneumoniae</i> (22)	9 (40.9)	13 (59)
<i>K. oxytoca</i> (3)	1 (33.3)	2 (66.7)
TOPLAM (144)	77	67

4.2. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatların Antibiyogram Sonuçları

İzole edilen 144 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının BD Phoenix Otomatize Mikrobiyoloji Sistem'ine göre antibiyogram sonuçları Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13: Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar ve Antibiyogram Sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	AMC	ATM	FEP	PTZ	CAZ	IMP	FOX	AK	SXT	CIP
1	EC001	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
2	EC002	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
3	KO003	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	S	R	S	S	I	S	R
4	KP004	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	S
5	EC005	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
6	EC006	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
7	EC007	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
8	EC008	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
9	EC009	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
10	EC010	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	R	R
11	EC012	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
12	KP013	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
13	EC014	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	R	S	S	S
14	EC016	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	S
15	EC017	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
16	EC018	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
17	EC021	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	R	R
18	EC023	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
19	EC024	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
20	KP025	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
21	EC026	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
22	EC027	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
23	EC028	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	S	R
24	EC029	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
25	EC031	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
26	EC032	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
27	EC033	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
28	EC035	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S
29	EC037	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
30	EC038	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
31	KP039	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
32	KP040	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
33	EC041	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
34	EC042	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
35	EC043	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
36	EC044	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
37	EC047	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
38	EC048	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
39	EC049	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
40	KP050	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
41	KP052	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
42	EC055	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
43	EC057	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
44	EC059	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
45	KP060	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
46	EC061	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S

Sıra No	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	AMC	ATM	FEP	PTZ	CAZ	IMP	FOX	AK	SXT	CIP
47	EC064	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
48	EC065	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S
49	EC067	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
50	EC068	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
51	EC069	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	R	S	R	R
52	KP070	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
53	KP071	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S
54	EC072	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
55	EC073	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
56	EC075	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
57	EC076	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
58	EC077	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
59	EC078	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
60	EC084	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
61	EC085	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
62	EC086	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
63	EC088	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
64	EC089	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
65	EC090	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
66	EC091	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
67	EC092	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
68	EC095	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
69	KP097	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
70	EC098	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
71	EC099	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R
72	EC100	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
73	EC101	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
74	EC102	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
75	EC103	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
76	EC104	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
77	EC105	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
78	EC106	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R
79	EC107	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
80	EC109	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	S	R
81	EC113	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	S
82	KP114	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
83	EC115	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
84	EC116	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
85	EC118	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	S
86	EC123	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	I	S	R	S
87	EC124	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	S	R
88	EC130	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
89	EC132	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
90	EC133	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
91	EC134	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	R	R
92	EC136	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R

Sıra No	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	AMC	ATM	FEP	PTZ	CAZ	IMF	FOX	AK	SXT	CIP
93	EC137	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
94	EC140	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
95	EC141	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
96	EC142	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
97	EC149	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
98	EC150	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	R	R
99	EC151	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
100	EC152	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
101	EC153	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
102	EC154	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
103	EC155	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
104	EC156	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
105	EC157	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
106	KO158	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
107	EC159	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
108	EC160	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
109	EC161	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
110	KP162	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
111	EC163	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
112	EC164	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	I	S	R	S
113	EC166	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
114	EC167	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
115	KP168	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
116	KP169	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	S
117	KP170	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
118	EC171	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
119	EC173	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
120	EC174	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
121	EC177	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
122	EC178	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
123	KP179	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
124	EC180	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S
125	EC181	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R
126	EC183	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R
127	EC184	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
128	EC185	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
129	EC188	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R
130	EC189	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
131	EC190	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
132	KP191	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
133	EC192	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
134	KP193	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
135	KP195	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
136	KP196	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
137	KO199	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
138	EC202	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	R	R

			AMC	ATM	FEP	PTZ	CAZ	IMP	FOX	AK	SXT	CIP
139	EC204	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
140	KP205	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
141	EC206	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
142	EC207	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
143	EC208	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
144	EC216	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R

AMC: Amoksisilin Klavulonik asit, ATM: Aztreonam, FEP: Sefepim, PTZ: Piperasilin-tazobaktam, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, FOX: Sefoksitin, AK: Amikasin, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, CIP: Siprofloksasin

4.2.1. *E. coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

Çalışmaya dahil edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14: *E. coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

	Direnç (%)										
Bakteri	AMC	ATM	FEP	PTZ	CAZ	IMP	FOX	AK	SXT	CIP	
<i>E.coli</i>	100	100	100	41.2	100	0	21	2.5	58	60	
<i>Klebsiella</i> spp.	100	100	100	52	100	0	12	8	56	28	

AMC: Amoksisilin Klavulonik asit, ATM: Aztreonam, FEP: Sefepim, PTZ: Piperasilin-tazobaktam, CAZ: Seftazidim, IMP: İmipenem, FOX: Sefoksitin, AK: Amikasin, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, CIP: Siprofloksasin

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemiyle Dirençle İlişkili Genlerin Araştırılması

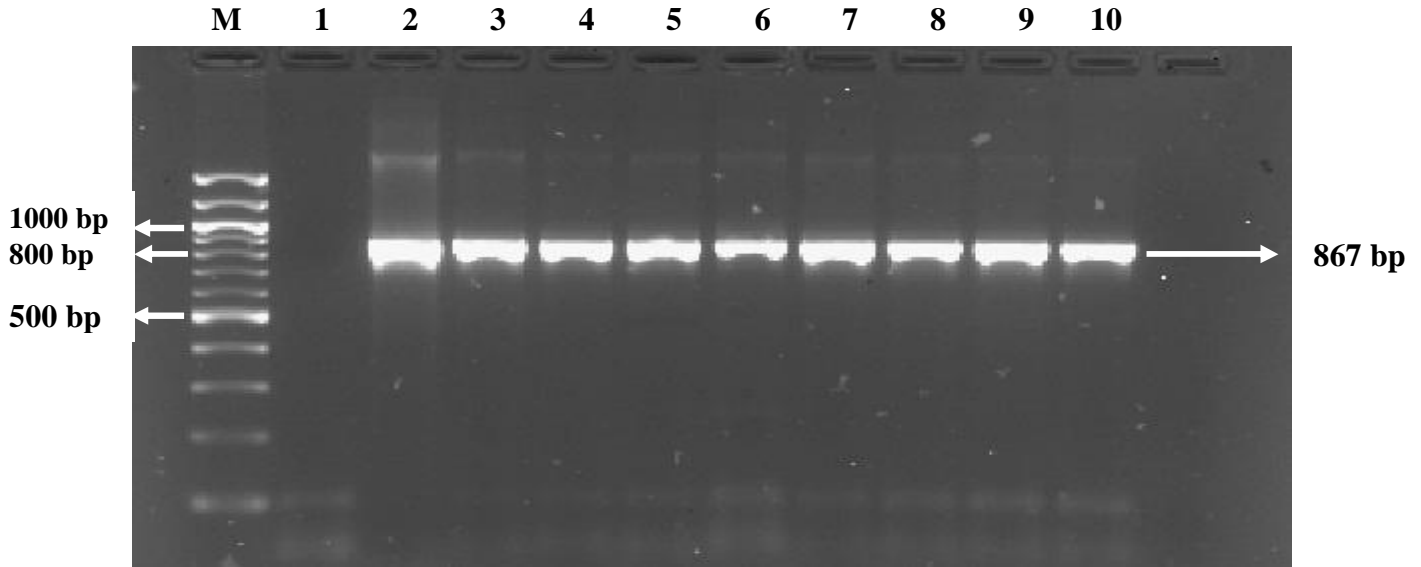
Çalışmamızda β -laktamaz enzim direncini PCR ile tespit etmek amacıyla 144 hastanın idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarından kaynatma metodu ile elde edilen DNA'lar kullanıldı.

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerine özgül primerler kullanarak hedef bölge geleneksel PCR yöntemi ile amplifiye edildi.

Geleneksel PCR yöntemi ile ayrıca bu bakteri gruplarında Sınıf 1 ve 2 İntegron varlığı araştırıldı.

4.3.1. *bla*_{TEM} Geninin Amplifikasyonu

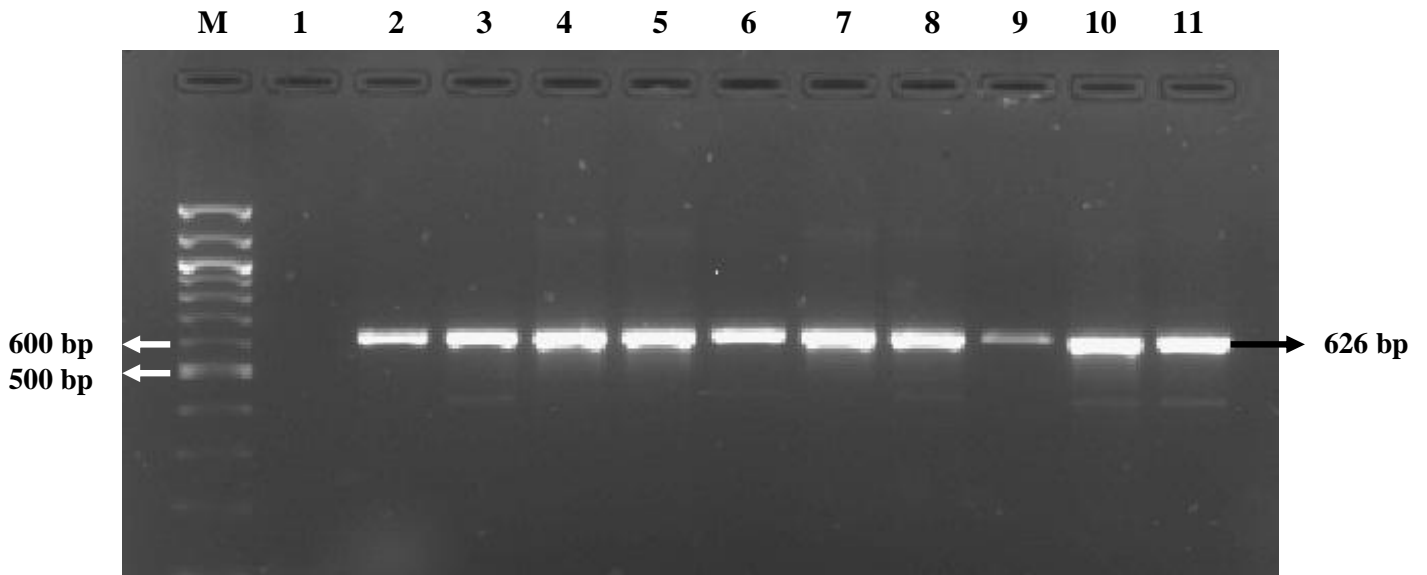
*bla*_{TEM} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 119 *E. coli* suşunun 73'ü ve 22 *K. pneumoniae* suşunun 5'i pozitif olarak belirlenmiştir. Örneklerle ait jel görüntüsü Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1: *bla*_{TEM} Geninin Agaroz Jel Elektroferez Görüntüsü. M: 100 bp DNA Marker, **1:** Negatif kontrol, **2:** Pozitif kontrol *E. coli* RP₄ (TEM-2), **3:** EC151, **4:** EC152, **5:** EC159, **6:** EC202, **7:** EC214, **8:** KP070, **9:** EC072, **10:** EC137

4.3.2. *bla*_{SHV} Geninin Amplifikasyonu

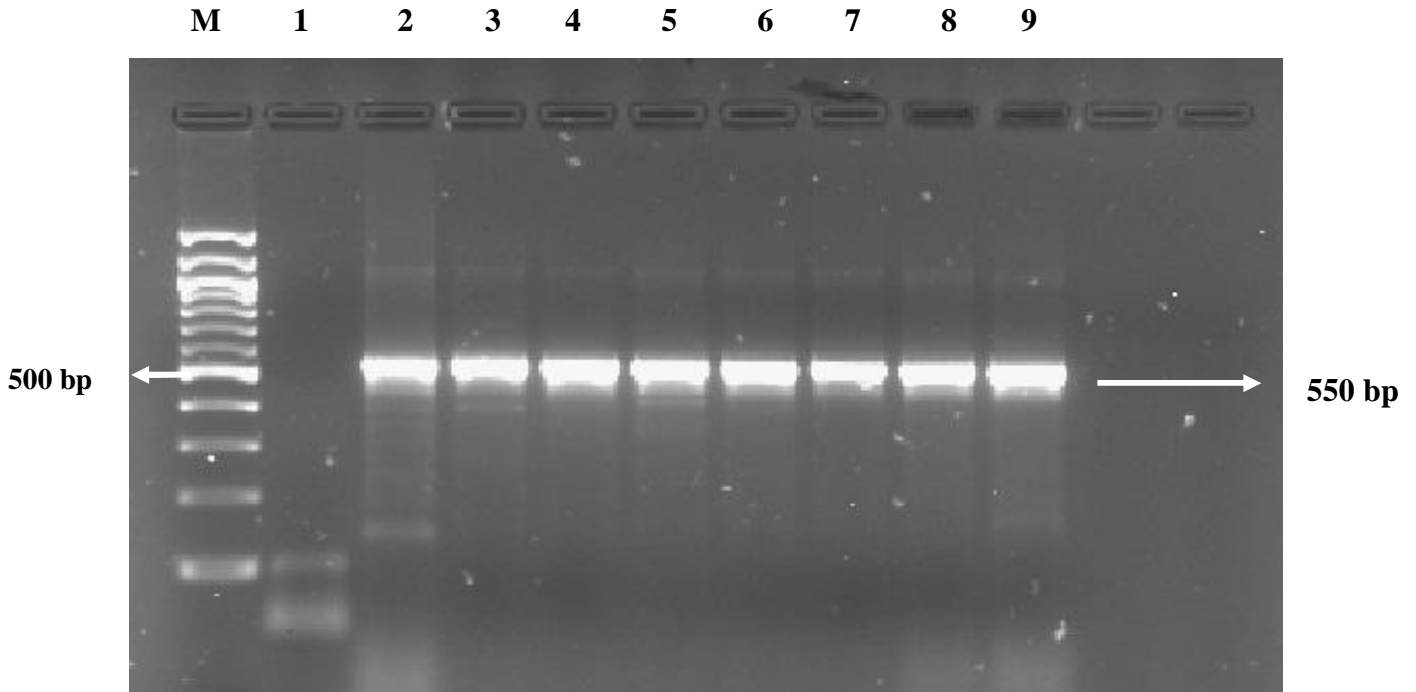
*bla*_{SHV} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu *E. coli* izolatlarından hiçbirinde pozitiflik görülmezken, 22 *K. pneumoniae* suşunun 20'si ve 3 *K. oxytoca* suşundan 1'i pozitif olarak saptanmıştır. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 2'de gösterilmiştir



Resim 2: *bla*_{SHV} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. M: 100 bp DNA Marker, 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol *E. coli* TRE40, 3: KP004, 4: KP025, 5: KP039, 6: KP050, 7: KP060, 8: KP071, 9: KP162, 10: KP169, 11: KP170

4.3.3. *bla*_{CTX-M} Geninin Amplifikasyonu

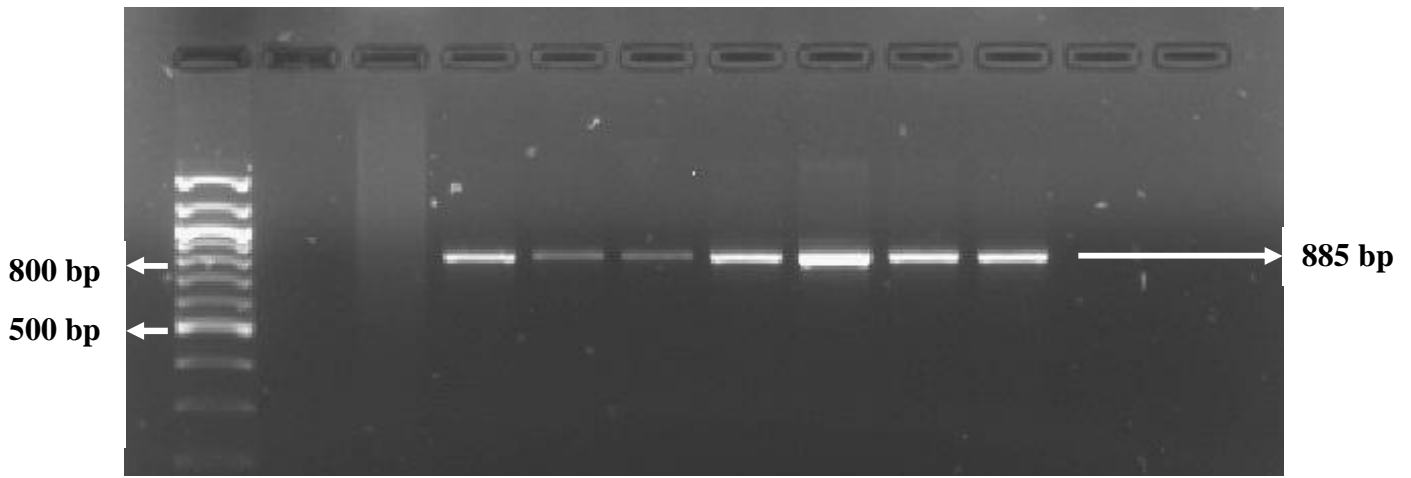
*bla*_{CTX-M} genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 119 *E. coli* suşunun 117'si, 22 *K. pneumoniae*'dan 19'u, 3 *K. oxytoca*'dan 1'i pozitif olarak belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 3'de verilmiştir.



Resim 3: *bla*_{CTX-M} Geninin Agaroz Jel Elektforez Görüntüsü. **M:** 100 bp DNA Marker, **1:** Negatif kontrol, **2:** Pozitif kontrol *E. coli* TRE40, **3:** EC085, **4:** EC088, **5:** EC089, **6:** EC091, **7:** KP168, **8:** KP169, **9:** KP170

4.3.4. *bla*_{OXA} Geninin Amplifikasyonu

*bla*_{OXA} genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 119 *E. coli* suşuna ait DNA örneğinden 70'inde, 22 *K. pneumoniae* suşunun 8'inde ve 3 *K. oxytoca* suşunun 1'inde uygun büyüklükte ürün elde edildi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 4'de verilmiştir.



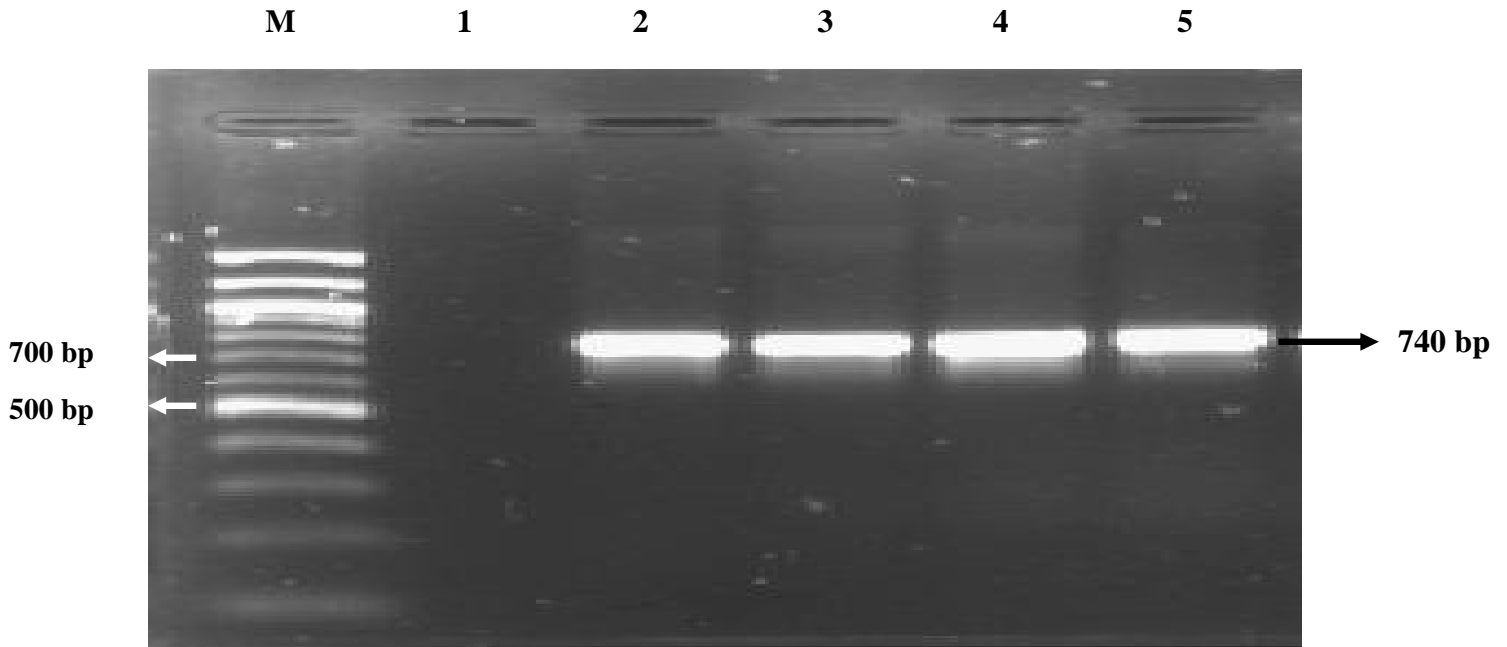
Resim 4: *bla*_{OXA} Geninin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü **M:** 100 bp DNA Marker, **1:** Negatif kontrol, **2:** Pozitif kontrol *E. coli* pMON 300 (OXA-1), **3:** EC001, **4:** EC002, **5:** KO003, **6:** KP004, **7:** EC005, **8:** EC008, **9:** EC009

4.3.5. *intI-1* Geninin Amplifikasyonu

intI-1 geninin saptanması için Lim KT ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem ve primerler referans alındı (10). Tüm suşlar *intI-1* geni bakımından negatif olarak saptandı. Primerlerin organizasyonu ve integras 1 genleriyle uyumu internet üzerinden araştırıldığında dizayn hatası olduğu belirlendi (95). Bu nedenle çalışma grubunda integras 1 geninin varlığı araştırılmadı.

4.3.6. *intI-2* Geninin Amplifikasyonu

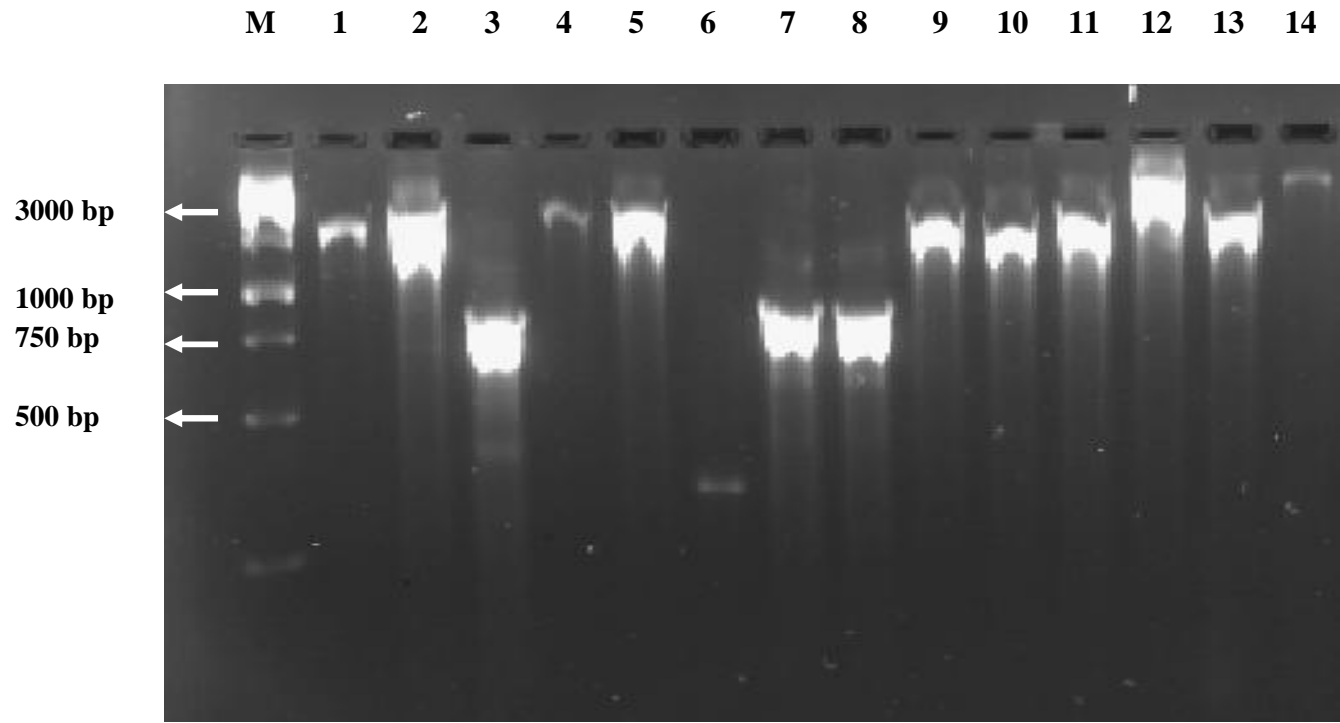
intI-2 genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu 144 örnekten 8 *E. coli* izolatı (%5.5) pozitif olarak belirlendi. *Klebsiella* spp. izolatlarında integras 2 geni saptanmadı. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 5’de verilmiştir.



Resim 5: *intI-2* Geninin Agaroz Jel Elektroferez Görüntüsü. **M:** 100 bp DNA Marker, **1:** Negatif kontrol, **2:** Pozitif kontrol, **3:** EC031, **4:** EC035, **5:** EC113

4.3.7. Sınıf 1 İntegron Amplifikasyonu

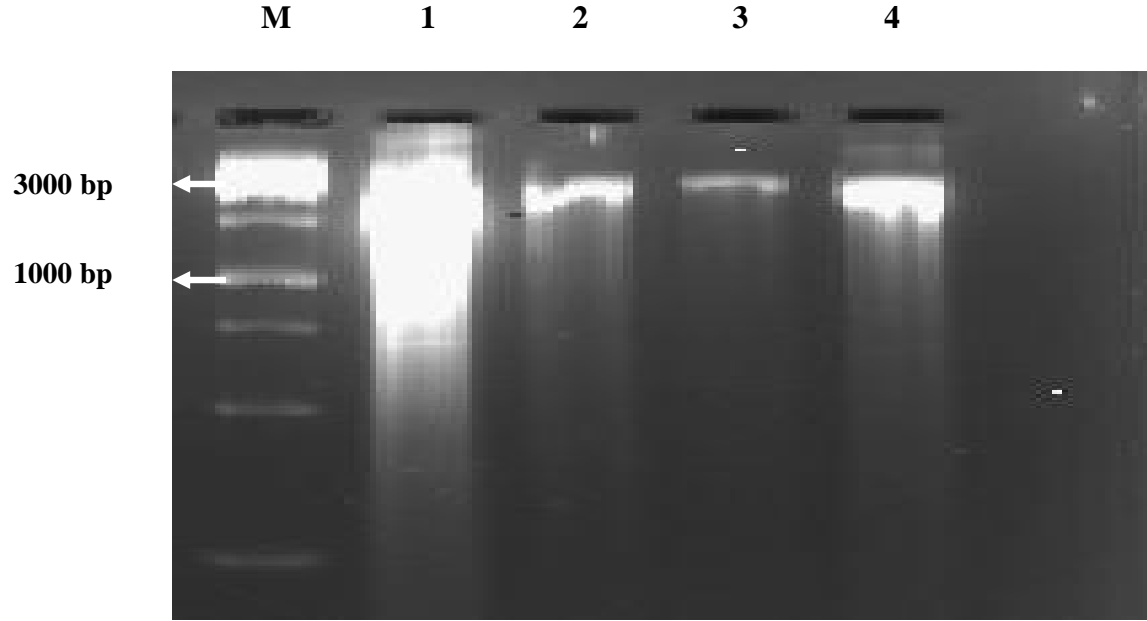
Lèvesque ve ark. tarafından rapor edilen yöntem ile Sınıf 1 integron varlığı araştırıldı (96). 5'CS ve 3'CS primerlerini kullanarak 119 *E. coli* suşunun 59'unda ve 22 *K. pneumoniae* suşunun 9'unda üç farklı büyüklükte Sınıf 1 integron belirlendi. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 6'da verilmiştir.



Resim 6: Sınıf 1 İntegron Varlığının Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. **M:** 1 kb DNA Marker, **1:** Pozitif kontrol, **2:** EC005, **3:** KP179, **4:** EC065, **5:** EC073, **6:** EC153, **7:** KP060, **8:** EC116, **9:** EC106, **10:** EC067, **11:** EC107, **12:** EC041, **13:** EC100, **14:** KP193

4.3.8. Sınıf 2 İntegron Amplifikasyonu

intI-2 genine özgül primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu pozitif çıkan 8 örnekte hep51 ve hep74 primerleri kullanılarak amplifikasyon yapıldı ve sonucunda 3 *E. coli* suşunun pozitif olduğu belirlenirken *Klebsiella* spp. izolatlarında Sınıf 2 integron saptanmadı. Örneklere ait jel görüntüsü Resim 7’de verilmiştir.



Resim 7: Sınıf 2 İntegron Varlığının Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. **M:** 1 kb DNA Marker, **1:** Pozitif kontrol, **2:** EC031, **3:** EC035, **4:** EC113

Çalışmamıza ait 144 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının PCR sonuçları Tablo 15’de sunulmuştur.

Tablo 15: Çalışma Grubuna Ait PCR Sonuçları

Sıra No	İzolat* Kodu	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>intI-2</i>	Sınıf 1 integron	Sınıf 2 integron
1	EC001	+	-	+	+	-	-	-
2	EC002	-	-	+	+	-	-	-
3	KO003	-	-	+	+	-	-	-
4	KP004	-	+	+	+	-	+	-
5	EC005	-	-	+	+	-	+	-
6	EC006	+	-	+	-	-	-	-
7	EC007	+	-	+	-	-	+	-
8	EC008	+	-	+	+	-	+	-
9	EC009	+	-	+	+	-	-	-
10	EC010	+	-	+	+	-	-	-
11	EC012	+	-	+	+	+	-	-
12	KP013	-	+	+	-	-	-	-
13	EC014	-	-	-	-	-	-	-
14	EC016	+	-	+	-	+	-	-
15	EC017	+	-	+	+	-	-	-
16	EC018	+	-	+	+	-	-	-
17	EC021	-	-	+	+	-	+	-
18	EC023	-	-	+	+	-	+	-
19	EC024	+	-	+	+	-	-	-
20	KP025	-	+	-	-	-	+	-
21	EC026	+	-	+	-	-	+	-
22	EC027	-	-	+	+	-	-	-
23	EC028	+	-	+	+	-	-	-
24	EC029	+	-	+	+	-	-	-
25	EC031	+	-	+	+	+	-	+
26	EC032	+	-	+	+	-	-	-
27	EC033	+	-	+	-	-	+	-
28	EC035	+	-	+	+	+	-	+
29	EC037	+	-	+	-	-	-	-
30	EC038	+	-	+	-	-	+	-
31	KP039	-	+	-	-	-	-	-
32	KP040	-	+	+	+	-	+	-
33	EC041	+	-	+	+	-	+	-
34	EC042	+	-	+	-	-	-	-
35	EC043	+	-	+	-	-	-	-
36	EC044	+	-	+	+	-	-	-
37	EC047	+	-	+	-	-	+	-
38	EC048	+	-	+	+	-	+	-

Sıra No	İzolat* Kodu	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>intl-2</i>	Sınıf 1 integron	Sınıf 2 integron
39	EC049	+	-	+	+	-	-	-
40	KP050	+	-	+	+	-	+	-
41	KP052	-	+	+	-	-	-	-
42	EC055	-	-	+	-	-	-	-
43	EC057	+	-	+	+	-	+	-
44	EC059	-	-	+	+	-	-	-
45	KP060	-	+	-	-	-	+	-
46	EC061	+	-	+	+	-	-	-
47	EC064	-	-	+	-	-	-	-
48	EC065	-	-	-	+	-	+	-
49	EC067	+	-	+	-	-	+	-
50	EC068	-	-	+	-	-	-	-
51	EC069	+	-	+	+	-	+	-
52	KP070	+	+	+	-	-	-	-
53	KP071	-	+	+	-	-	-	-
54	EC072	+	-	+	-	-	-	-
55	EC073	-	-	+	+	-	+	-
56	EC075	+	-	+	+	-	-	-
57	EC076	-	-	+	+	-	+	-
58	EC077	-	-	+	-	-	-	-
59	EC078	+	-	+	+	-	+	-
60	EC084	+	-	+	-	-	+	-
61	EC085	+	-	+	+	-	+	-
62	EC086	+	-	+	-	-	-	-
63	EC088	+	-	+	-	-	+	-
64	EC089	-	-	+	+	-	-	-
65	EC090	+	-	+	+	-	-	-
66	EC091	+	-	+	+	-	+	-
67	EC092	+	-	+	-	-	+	-
68	EC095	+	-	+	+	-	-	-
69	KP097	-	+	+	+	-	+	-
70	EC098	+	-	+	-	-	+	-
71	EC099	-	-	+	+	-	+	-
72	EC100	-	-	+	+	-	+	-
73	EC101	+	-	+	-	-	-	-
74	EC102	-	-	+	+	-	-	-
75	EC103	-	-	+	-	-	+	-
76	EC104	+	-	+	-	-	-	-
77	EC105	+	-	+	+	-	-	-

Sıra No	İzolat* Kodu	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>intI-2</i>	Smf 1 integron	Smf 2 integron
78	EC106	-	-	+	+	-	+	-
79	EC107	-	-	+	+	-	+	-
80	EC109	+	-	+	-	-	-	-
81	EC113	+	-	+	-	+	-	+
82	KP114	-	+	+	+	-	-	-
83	EC115	+	-	+	+	-	+	-
84	EC116	+	-	+	-	-	+	-
85	EC118	+	-	+	+	-	+	-
86	EC123	+	-	+	-	-	-	-
87	EC124	-	-	+	-	-	-	-
88	EC130	+	-	+	-	-	-	-
89	EC132	+	-	+	-	-	+	-
90	EC133	+	-	+	+	-	-	-
91	EC134	+	-	+	-	-	+	-
92	EC136	-	-	+	+	-	+	-
93	EC137	+	-	+	-	-	-	-
94	EC140	+	-	+	-	-	+	-
95	EC141	+	-	+	-	-	-	-
96	EC142	+	-	+	+	-	+	-
97	EC149	-	-	+	+	-	-	-
98	EC150	-	-	+	+	-	+	-
99	EC151	+	-	+	+	-	-	-
100	EC152	-	-	+	+	-	-	-
101	EC153	+	-	+	-	-	+	-
102	EC154	+	-	+	-	-	-	-
103	EC155	-	-	+	+	-	+	-
104	EC156	-	-	+	+	-	+	-
105	EC157	+	-	+	-	-	+	-
106	KO158	-	+	-	-	-	-	-
107	EC159	+	-	+	-	-	+	-
108	EC160	-	-	+	+	+	+	-
109	EC161	-	-	+	+	-	+	-
110	KP162	-	+	+	-	-	-	-
111	EC163	+	-	+	+	-	-	-
112	EC164	+	-	+	+	-	-	-
113	EC166	+	-	+	+	-	-	-
114	EC167	+	-	+	-	+	+	-
115	KP168	+	+	+	-	-	+	-
116	KP169	-	+	+	-	-	-	-

Sıra No	İzolat* Kodu	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>intI-2</i>	Smf 1 integron	Smf 2 integron
117	KP170	-	+	+	-	-	-	-
118	EC171	-	-	+	+	-	+	-
119	EC173	-	-	+	+	-	+	-
120	EC174	-	-	+	-	-	+	-
121	EC177	-	-	+	+	-	+	-
122	EC178	-	-	+	-	-	-	-
123	KP179	+	+	+	+	-	+	-
124	EC180	-	-	+	-	-	+	-
125	EC181	-	-	+	+	-	-	-
126	EC183	-	-	+	+	-	+	-
127	EC184	-	-	+	-	-	-	-
128	EC185	+	-	+	-	-	+	-
129	EC188	+	-	+	+	-	+	-
130	EC189	-	-	+	+	-	+	-
131	EC190	+	-	+	-	+	+	-
132	KP191	+	+	+	+	-	-	-
133	EC192	-	-	+	+	-	+	-
134	KP193	-	+	+	-	-	+	-
135	KP195	-	+	+	+	-	-	-
136	KP196	-	+	+	-	-	-	-
137	KO199	-	-	+	-	-	-	-
138	EC202	+	-	-	-	-	-	-
139	EC204	+	-	+	-	-	-	-
140	KP205	-	+	+	-	-	-	-
141	EC206	-	-	+	+	-	+	-
142	EC207	-	-	+	-	-	-	-
143	EC208	-	-	+	+	-	+	-
144	EC216	-	-	+	+	-	-	-

*EC; *Escherichia coli*, KP; *Klebsiella pneumoniae*, KO; *Klebsiella oxytoca*

4.3.1. İzolatlara Göre Direncin ve İntegron Varlığının Dağılımı

İzolatlara göre direncin ve integron varlığının dağılımı Tablo 16’da sunulmuştur.

Tablo 16: Türlere Göre Direncin ve İntegron Varlığının Dağılımı

İzolot (Toplam)	<i>bla</i> _{TEM} n (%)	<i>bla</i> _{SHV} n (%)	<i>bla</i> _{CTX-M} n (%)	<i>bla</i> _{OXA} n (%)	Sınıf 1 integron n (%)	Sınıf 2 integron n (%)
<i>E. coli</i> (119)	73 (61.3)	0	117 (98.3)	70 (58.8)	59 (49.6)	3 (2.5)
<i>K. pneumoniae</i> (22)	5 (22.8)	20 (90.9)	19 (86.4)	8 (36.4)	9 (40.9)	0
<i>K. oxytoca</i> (3)	0	1 (33.3)	2 (66.7)	1 (33.3)	0	0
Klebsiella toplamı (25)	5 (20)	21 (84)	21 (84)	9 (36)	9 (36)	0
TOPLAM (144)	78 (54.2)	21 (14.6)	138 (95.8)	79 (54.9)	68 (47.2)	3 (2.1)

4.3.2. Direnç Genlerinin Birlikte Bulunma Durumları

Çalışmamızda belirlenen direnç genlerinin izolatlarda birlikte bulunma durumlarına ait veriler Tablo 17’de belirtilmiştir.

Tablo 17: İzolatlardaki Direnç Genlerinin Birlikte Bulunma Durumları

	<i>E. coli</i> (n=119)	<i>K. pneumoniae</i> (n=22)	<i>K. oxytoca</i> (n=3)	Toplam n=144 (%)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	0	4	0	4 (2.8)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	71	5	0	76 (52.8)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA}	36	2	0	38 (26.4)
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	0	18	0	18 (12.5)
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{OXA}	0	7	0	7 (4.9)
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	68	8	1	77 (53.5)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	0	4	0	4 (2.8)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	38	3	0	41 (28.5)
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	0	7	0	7 (4.9)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	0	2	0	2

5. TARTIŞMA

GSBL'ler *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri arasında hızla yayılmaktadır. Özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında GSBL'lerin yayılışı ciddi mikrobiyolojik ve klinik öneme sahiptir (97). GSBL enzimlerinin 1980'lerde fark edildiklerinde TEM ya da SHV tipi β -laktamazlardan köken aldıkları belirlenmiştir. Günümüzde ise özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatları arasında CTX-M tip GSBL'nin daha yaygın olduğu görülmektedir (98, 99).

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'ne 18 Mayıs 2010 ile 31 Ağustos 2010 tarihleri arasında kabul edilen 5057 idrar örneğinden yapılan aerob kültürlerde üreyen ve etken olarak rapor edilen izolatlar arasından, dublike olmayan 541 *E. coli* ve 137 *Klebsiella* spp. izolatı incelendi. Bakterilerin fenotipik olarak GSBL üretimi Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) otomatize sistem tarafından belirlendi.

Çalışmamızda, toplam 678 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının %24.8'i GSBL pozitif olarak belirlendi. Servis hastalarından izole edilen örneklerde bu oran %63.2'i olarak gözlenirken polikliniklerden gelen örneklerden izole edilenlerde GSBL pozitifliği %15.4 olarak saptandı. Bu toplamda 541 *E. coli* izolatından 142'sinin (%26.2) GSBL ürettiği belirlendi. Hastanemizde Özgümüş ve ark.'nın (100) yaptıkları bir çalışmada 61 *E. coli* izolatının 13'ünün (%21.3) GSBL ürettiği belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin %1-54.4 arasında değiştiği bildirilmiştir (101). Bali ve ark.'nın (102) üniversite hastanesinde yaptıkları bir çalışmada *E. coli*'de GSBL pozitifliğini %46.8 olarak saptamışlardır. Bazı çalışmalarda ise oranlar daha düşük (%18 civarı) bulunmuştur (103, 104, 105). Çalışmamızda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Buna karşın Hollanda popülasyonunda Sturm ve ark.'nın (106) yaptıkları çalışmada *E. coli* izolatlarında GSBL prevalansını %2.1 olarak rapor etmişlerdir. Reinert ve ark. (107) tarafından rapor edilen Tigesiklin evölüsyon ve sürveyans raporuna (TEST) göre Avrupa

bölgesinde *E. coli* izolatları arasında GSBL prevalansını %7.6 olarak bildirmiştir. Ülkemize ait veriler göstermiştir ki *E. coli* izolatlarında saptanan GSBL prevalansı Avrupa düzeyinin üzerindedir.

E. coli izolatlarının büyük çoğunluğunun (%85.2) poliklinik hastalarına ait örneklerde üremelerine karşın GSBL pozitifliği, poliklinik hastalarında %16.3 iken, servislerden gelen örneklerde %83.8 olarak saptandı. Gür ve ark.'nın (108) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada *E. coli* izolatlarında GSBL prevalansını %42 olarak bulmuşlardır. Karlı ve ark.'nın (105) İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada *E. coli* izolatlarında GSBL prevalansını, poliklinik izolatlarında %12, servis izolatlarında ise %27.8 olarak saptamışlardır. Bir çalışmada nozokomiyal kaynaklı *E. coli* izolatlarında GSBL prevalansı %24.41 olarak belirlenmiştir (109).

Yapılan çalışmalarda servis ve poliklinik hastalarından alınan örneklerden üreyen bakteriler karşılaştırıldığında servis grubunda direnç oranının daha çok olduğu bildirilmiştir (110). Hastaneler antibiyotik kullanımının yoğun olduğu birimlerdir. Antibiyotik baskısı altında dirençli organizmaların ortaya çıkışı ve yayılışı daha hızlı olmaktadır (111). Buna paralel olarak GSBL üretimi de servisten gelen örneklerden izole edilen suşlarda daha yüksek olarak bulunmuştur (103). Çalışmamızda da benzer şekilde *E. coli* izolatlarındaki GSBL direncinin servisten gelen örneklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, direnç oranı oldukça yüksektir (%83.8). Bunun nedeni olarak hastane florasının dirençli suşlardan oluşması veya çift disk sinerji testi ile GSBL varlığının doğrulanmamış olması gibi nedenler olabilir. Zira Sturm ve ark. (106) Phoenix otomatize sistemde belirlenen GSBL pozitifliğinin diğer GSBL belirleme yöntemleriyle doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada toplam 137 *Klebsiella* spp. izolatının 26'sının (%19) GSBL ürettiği belirlenmiştir. Sadece *K. pneumoniae* izolatlarındaki GSBL oranı ise %22.2 olarak belirlendi. Özgümiş ve ark.'nın (100) hastanemizde yaptıkları çalışmada *Klebsiella* izolatlarında ki GSBL pozitifliğini %26.2 olarak saptamışlardır. Bozkurt ve ark.'nın (109) yaptıkları bir çalışmada *Klebsiella* spp. izolatlarındaki GSBL prevalansını %42.85 olarak saptamışlardır. Işık ve ark.'nın (112) Konya'da 2007 yılında yayınladıkları bir çalışmada 154 *Klebsiella* spp. suşunun %56.5'nin GSBL oluşturduğunu belirlemelerine karşın Albayrak ve ark.'ı (103) bu oranı Çankırı'da %21.9 olarak bildirmişlerdir. *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında GSBL prevalansının bölgeye göre ve çalışılan test sistemine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir

(108). Sturm ve ark.'ı (106) *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL prevalansını %5.2 olarak rapor etmiştir. TEST raporuna göre Avrupa bölgesinde *Klebsiella* izolatlarında GSBL pozitifliği %13.3 olarak belirlenmiştir (107). Ülkemizdeki *Klebsiella* izolatlarındaki GSBL prevalansının Avrupa düzeyinin üzerinde olduğu görülmektedir.

K. pneumoniae'deki GSBL pozitifliği %22.2 olarak belirlenirken bu oran poliklinik hastalarında %15, servis hastalarında ise %33.3 olarak belirlendi. *K. oxytoca*'da ise GSBL pozitifliği %19 olarak saptandı. Servisten gelen 9 örnekten 4'ünün (%44.4) GSBL ürettiği gösterildi. Çok merkezli bir çalışmada Gür ve ark.'ı (108) *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL prevalansını %41.4 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının amoksisilin klavulonik asit, aztreonam, sefepim ve seftazidime direnç oranları %100 olarak belirlenirken *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının piperasilin-tazobaktam (PTZ), sefoksitin (FOX), amikasin (AK), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) ve siprofloksasine (CIP) direnç oranları sırasıyla %41.2 ve %52; %21 ve %12; %2.5 ve %8; %58 ve %56; %60 ve %28 olarak saptandı. Ayrıca *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının imipeneme direnç göstermediği de belirlendi.

Öksüz ve ark.'nın (113) yaptıkları bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarındaki SXT direnci sırasıyla %83 ve %86 olduğunu saptamışlardır. PTZ oranını sırasıyla %25 ve %61, AK oranını %0 ve %11, CIP %75 ve %18 olarak saptamışlardır. Gram negatif nonfermentatif bakteri enfeksiyonlarında seçenek olarak kullanılan siprofloksasine karşı özellikle *E. coli* izolatlarında yüksek direncin bulunduğu görülmüştür. Öztel Ocak ve ark.'ı (114) KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarı tüm *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında 2006 yılında siprofloksasin direncini sırasıyla %29 ve %21; 2007 yılında ise %26 ve %17 oranında bulmuşlardır. Çalışmamızda, GSBL pozitif izolatlarda bu oranın çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu veri, ampirik tedavinin planlanmasında etkenin direnç paterninin bilinmesinin çok önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Livermore ve ark. (99) 1980'li yıllardakinden farklı olarak günümüzde *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında CTX-M tip β -laktamazların daha yaygın olduğunu belirtmektedirler. Çalışmamızda GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında TEM, SHV, CTX-M ve OXA tip enzimleri kodlayan genlerin prevalansı sırasıyla %54.2, %14.6, %95.8 ve %54.9 olduğu belirlendi. CTX-M'in en sık rastlanan gen olduğu saptandı.

E. coli izolatlarında CTX-M tip β -laktamaz gen oranı %98.3 iken TEM ve OXA tip β -laktamazların oranı sırasıyla %61.3 ve %58.8 olarak belirlendi. SHV tip β -laktamaz genine rastlanmadı.

Klebsiella spp. izolatlarında TEM, SHV, CTX-M ve OXA tip enzimleri kodlayan genlerin prevalansı sırasıyla %20, %84, %84, %36 olarak saptandı. Nazik ve ark.'nın (115) yaptıkları bir çalışmada GSBL üreten *Klebsiella* spp. izolatlarında CTX-M sıklığını benzer şekilde %84 olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki CTX-M tipi GSBL'nin yayılımı pandemiktir ve günümüzde *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında 3.kuşak sefalosporinlere direncin ana sebebi olarak vurgulanmaktadır (116).

Çok merkezli bir çalışmada ülkemizde GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* izolatlarında bla_{CTX-M} pozitifliği %96.2, bla_{TEM} %53.1 ve bla_{SHV} pozitifliği %51.4 olarak bulunmuştur (108). Aynı çalışmada farklı merkezlerde direnç genlerinin oranları arasında da farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Hastanemizin de içinde bulunduğu, Hoşoğlu ve ark. (117) tarafından 2007 yılında yayınlanan çok merkezli bir çalışmada *E. coli* izolatlarındaki bla_{TEM} ve bla_{SHV} geninin oranı %65.1 ve %28.6 iken *K. pneumoniae*'de bu oranın %46.3 ve %48.8 olduğu saptanmıştır. Ancak bu çalışmada bölgelere ait veriler verilmemiştir. Sharma ve ark. (118) tarafından *K. pneumoniae*'daki bla_{SHV} gen prevalansı, çalışmamıza benzer oranda (%72) bildirilmiştir. Çalışmamızda bla_{CTX-M} pozitifliği çok merkezli çalışmada ki verilerle benzerlik gösterirken, bla_{TEM} geninin bölgemizde daha yüksek oranda bulunduğu ve *E. coli*'de geçmiş verilerle tezat oluşturacak şekilde bla_{SHV} geninin saptanmadığı görülmüştür.

Öksüz ve ark.'nın (113) İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada *E. coli*'deki bla_{TEM} ve bla_{CTX-M} pozitiflik oranının çalışmamızla benzer olduğu görülmüştür (%66.7, %83.3). Çalışmada *E. coli*'deki bla_{SHV} pozitifliğinin %25 olarak belirlenmesine karşın çalışmamızda pozitiflik saptanmamıştır.

Tüm dünyada bla_{CTX-M} günümüzde GSBL üretiminden sorumlu genlerin başında gelmektedir (99). Çalışmamızdaki CTX-M prevalansına (%98.3) benzer şekilde Peirano ve ark.'nın (119) Kanada'da yaptıkları bir çalışmada bla_{CTX-M} gen pozitifliğini %95 olarak rapor etmişlerdir. Avusturya ve İtalya'da Huemer ve ark.'nın (120) yaptıkları çalışmada GSBL üreten *E. coli* izolatlarında %90 oranında CTX-M geni saptamışlardır. İsveç'de 2001 ve 2006 yılları arasında GSBL üreten *E. coli* izolatları arasında %92 CTX-M pozitifliği rapor edilmiştir (121). Buna karşın gen prevalansının düşük olarak rapor edildiği çalışmalar da

bulunmaktadır (121, 122). Sonuçlardaki çeşitliliğin nedeni olarak, kullanılan yöntem ve primerlerdeki farklılıkların yanında bölgesel bakteri popülasyonundaki farklılıkların da rol alabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda TEM tipi β -laktamaz gen prevalansı *E. coli* izolatlarında *Klebsiella* spp. izolatlarına göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Ülkemizde ve yurtdışında yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında *E. coli* izolatları için benzer oranlar gözlenirken, *Klebsiella* spp. izolatlarında daha yüksek oranlarla karşılaşılmaktadır. Çalışmamızda bulduğumuz *Klebsiella* spp. izolatlarındaki %20'lik *bla*_{TEM} prevalansı, bölgesel farklılıkların ne kadar anlamlı ve bilinmesinin yararlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda *Klebsiella* spp. izolatlarındaki *bla*_{SHV} prevalansı benzer çalışmalara göre yüksek, *bla*_{CTX-M} ile aynı oranda bulunmuştur. Literatürde de yüksek oranların bildirildiği çalışmaların bulunmasına karşın (118), bu veri tarafımızdan bölgemizde *bla*_{SHV} gen yayılımının arttığı şeklinde yorumlanmaktadır. *bla*_{SHV} gen prevalansı baskın olarak *Klebsiella* spp. izolatlarında saptanmakla birlikte *E. coli* izolatlarında da izlenebilmektedir. Ancak, çalışmamızda *E. coli* suşlarında *bla*_{SHV} genine rastlanmamıştır. Huemer ve ark.'nın (120) yaptıkları bir çalışmada Avusturya ve İtalya'dan toplanan GSBL pozitif toplam 62 *E. coli* izolatından yalnızca 1'inde *bla*_{SHV} genine rastlanmıştır İtalya örneklerinde çalışmamıza benzer şekilde *bla*_{SHV} rapor edilmemiştir (121).

Çalışmamızda *bla*_{OXA} gen prevalansı *E. coli* izolatlarında *Klebsiella* spp. izolatlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Ülkemizde *bla*_{OXA} gen prevalansı ile ilgili veri sınırlıdır. Ülkemizde 2001 yılında *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-47 ve OXA-48 gen varlığı belirlenmiş ve bu genlerin plazmidle aktarıldığı saptanmıştır (123, 124). Ancak genel anlamda *bla*_{OXA} prevalansı ile ilgili yayınlanmış bir veriye ulaşamamıştır. Huemer ve ark. (120) *bla*_{OXA} prevalansını %48.4 bulmuşlardır. Bu verinin bulgularımızla uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmada *E. coli* izolatlarında *bla*_{CTX-M} gen prevalansı beklendiği şekilde yüksek oranlarda bulunmuştur. Bununla birlikte, *bla*_{TEM} geni beklentilerin üzerinde görülmesine karşın; *bla*_{SHV} geni 119 suşun hiçbirinde saptanmamıştır. *Klebsiella* spp. izolatlarındaki *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} gen prevalansı ve literatür verileri karşılaştırıldığında da benzer şekilde daha yüksek oranlar belirlenmiştir. Çok merkezli

çalışmaların vurguladıkları “direnç genleri prevalansındaki bölgesel farklılıklar” ifadesi, çalışmamıza ait veriler ile Türkiye verilerini karşılaştırdığımızda bir kez daha görülmüştür (108, 117).

İntegronlar antibiyotik direncinin yayılımında önemli genetik elementlerdendir. Çalışmamızda GSBL pozitif 119 *E. coli* suşunun 59’unda (%49.6) sınıf 1 integron, 3’ünde (%2.5) sınıf 2 integron bulundu. Yirmi beş *Klebsiella* spp. izolatından ise 9’unda (%36) sınıf 1 integron saptandı. Sandallı ve ark. (125) tarafından Rize’de bir devlet hastanesinden toplanan örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarında sınıf 1 integron prevalansını %36.1, sınıf 2 integron prevalansını da %1.4 bulmuşlardır. İzolatların tümünün GSBL olmadığı göz önüne alındığında bu oranın bölgemiz için benzer olduğu ortaya çıkmaktadır. *Klebsiella* spp. izolatlarında integrona rastlanmamıştır. Rao ve ark. (126) ABD’de 320 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatını kullanarak yaptıkları bir çalışmada sınıf 1 integron prevalansını *E. coli*’de %57, *Klebsiella* spp. izolatlarında %70 olarak bildirmektedir. Üriner sistem infeksiyonlarında sınıf 1 ve 2 integronların yayılmakta olduğu bildirilmektedir (127). Antibiyotik kullanımını tehdit eden bu riskin bölgemiz için de risk olduğu ve takip edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 144 GSBL üreten 119 *E. coli* ve 25 *Klebsiella* spp. izolatında direnç genlerinin durumları incelendiğinde 12 (%10.1) *E. coli* ve 5 (%20) *Klebsiella* spp. izolatında sadece 1 gen saptandığı görüldü. Gen birlikteliğine baktığımızda, *bla_{TEM}* ve *bla_{CTX-M}* gen birlikteliğinin 119 *E. coli* suşunun 71’i (%59.7) ve 22 *K. pneumonia* suşunda 5’inde (%22.8) saptandığı, bunun yanında 36 *E. coli* suşu ve 2 *K. pneumonia* suşunda *bla_{TEM}* ve *bla_{OXA}* genler birlikte saptanırken *K. oxytoca*’da bu iki gen birlikteliğine rastlanmadığı görüldü.

Ayrıca *E. coli*’de *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* birlikteliği saptanmazken, *K. pneumoiae* suşunun 4’ünde (%18.2) *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* gen birlikteliği belirlendi. *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}* 38 *E. coli* (%32) ve 3 *K. pneumoniae*’da (%13.6), *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* birlikteliği yalnızca 4 *K. pneumoniae* suşunda (%18.2), *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*’nın ise yalnızca 7 *K. pneumoniae* suşunda (%31.9) saptandı. PCR ile saptanan dört genin birlikte bulunma durumu ise sadece 2 *K. pneumoniae* suşunda (%9.1) görüldü.

Çalışmamızda 1 *E. coli* suşunda *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXA}* genlerinden hiçbirini saptanmadı. Çeşitli çalışmalarda benzer şekilde GSBL üretmesine karşın belirtilen genler

bulunmamıştır. Bunun nedeni olarak izolatın Phoenix otomatize sistemde yanlış tanımlanması olabileceği gibi izolatın dirence neden olan ve bu çalışmada incelenmeyen farklı gen veya mekanizmalara sahip olması söylenebilir. Bu nedenle Sturm ve ark. (106) tarafından da önerildiği gibi Phoenix otomatize sistemde belirlenen GSBL pozitifliğinin bir başka yöntemle doğrulanması yararlı olacaktır.

Çeşitli çalışmalarda aynı izolatta birden fazla β -laktamaz geninin birlikteliği gösterilmiştir. KTÜ Tıp Fakültesi'nde 2000 yılında yapılan bir çalışmada GSBL üreten 20 enterik bakteri suşu arasında *E. coli*'den 3'ünün (% 15) TEM ve SHV-tiplerinin ikisini birden, 4'ünün (% 20) sadece SHV-tipini taşıdığı, 2'sinin (% 10) her iki geni de taşımadığı belirlenmiştir. *Klebsiella* spp. izolatlarının 6'sının (% 30) TEM ve SHV-tiplerinin ikisini, 2'sinin (% 10) sadece SHV-türevlerini taşıdığı, 1'inin (% 5) ise her iki geni de taşımadığı belirlenmiştir (100). On yıl sonra toplanan örneklerle yaptığımız çalışmada *bla*_{SHV} genine dolayısıyla SHV kombinasyonlarına *E. coli*'de rastlanmadı. En yüksek oranda *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} birlikteliğine rastlanmıştır. Dağlar ve ark.'nın (128) Antalya'da yaptıkları bir çalışmada, toplam 56 GSBL üreten *E. coli* izolatının 29'u (%52) *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} geni birlikteliği, 3'ü (%5.4) *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV}, 3'ü de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV}'yi birlikte bulundurduğunu saptamışlardır.

Öksüz ve ark.'nın (113) 12 *E. coli* ve 28 *K. pneumoniae* suşlarında yaptıkları çalışmada 7 suş *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} genlerini, 8 suş *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} genlerini, 6 suş *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerini, 12 suş ise *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerini birlikte taşımaktadır. 5 suşun sadece *bla*_{SHV} genini, 6 suşun da sadece *bla*_{CTX-M} genini taşıdığı saptanmıştır.

Mulvey ve ark.'nın (129) Kanada'da yaptıkları çalışmada 12 *E. coli* izolatının 2'sinde yalnızca SHV geni, 1 tanesinde *bla*_{SHV} + *bla*_{TEM}, 1'inde *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M}, 2'sinde *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}, 4'ünde yalnızca *bla*_{CTX-M} geni belirlenirken 2 izolatta hiçbir gen saptanmamıştır. 2 *K. oxytoca* izolatının 1'inde *bla*_{TEM} diğeri de *bla*_{CTX-M} geni belirlenmiştir.

Pongpech ve ark. (130) 37 GSBL üreten *E. coli* izolatının 25'inin *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} genini birlikte taşıdığı, 2 izolatın da *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M}'i taşıdığı ve 3 izolatta da hiçbir genin saptanmadığını belirtmişlerdir. Ode ve ark. (131) GSBL üreten 46 *E. coli* izolatının 20'sinde *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} kombinasyonuna rastlarken 27 *K. oxytoca* suşunun 12'sinde *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} birlikteliğine rastlamışlardır.

14. SONUÇ VE ÖNERİLER

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'ne 18 Mayıs - 31 Ağustos 2010 tarihleri arasında kabul edilen 5057 idrar örneğinden yapılan kültür sonucu üreyen 541 *E. coli* ve 137 *Klebsiella* spp. izolatu incelendi. Çalışmalar sonucu toplam üropatojen 541 *E. coli* izolatının 142'sinin (%26.2) ve toplam 137 *Klebsiella* spp. izolatında 26'sının (%19) GSBL ürettiği belirlendi.

GSBL prevalansı servis hastalarından alınan örneklerde üreyen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında %63.2 oranında görülürken poliklinik hastalarında %15.4 olarak belirlendi. Hastane kaynaklı enfeksiyonlardaki yüksek antibiyotik direnci, antibiyotik yazımında ve enfeksiyon kontrol uygulamalarında daha sıkı önlemler alınması gerektiğini ve antibiyotik dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkışını sınırlandırmak için antibiyotik hassasiyet testlerinin mutlaka yapılması gerektiğini bir kez daha vurgulamaktadır.

Çalışmamızda GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının amoksisilin klavulonik asit, aztreonam, sefepim ve seftazidime direnç oranlarının %100 olduğu belirlendi. *E. coli*'nin piperasilin-tazobaktam direnci %41.2, sefoksitine %21, amikasine %2.5, trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasine direncin %58 ve %60 olduğu saptandı. *Klebsiella* spp.'de ise piperasilin-tazobaktam direnci %52, sefoksitin %12, amikasin %8, trimetoprim-sülfametoksazol %56 ve siprofloksasine direncin %28 olduğu belirlendi. Bunun yanında izolatlarımızın imipeneme direnç göstermediği de belirlendi. Bu sonuçlar tedavinin mutlaka antibiyotik duyarlılık testleriyle birlikte planlanmasının önemini göstermektedir. Çalışmamız ayrıca ampirik tedavi için antibiyotik tercihi için veri oluşturacaktır.

PCR deneylerinde 119 GSBL pozitif *E. coli* suşunun *bla*_{TEM} oranı %62.2 ve *bla*_{OXA} gen varlığının %59.7 olduğu saptandı. Bu izolatlarda en yaygın gen prevalansının %98.3 oranında *bla*_{CTX-M} olduğu görüldü. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında *bla*_{SHV} genine ise rastlanmadı.

Klebsiella spp. izolatlarında ise baskın olan genin %84 oranında *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} olduğu saptandı. Ayrıca *bla*_{TEM} oranı %20, *bla*_{OXA} oranı ise %36 olarak bulundu. *E. coli* izolatlarında olduğu gibi *Klebsiella* spp. izolatlarında da baskın olan genin CTX-M olduğu saptandı (%84). CTX-M tipi GSBL'nin yayılımı pandemiktir ve günümüzde tüm dünyada olduğu gibi bölgemizdeki *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında da 3.kuşak sefalosporinlere direncin ana sebebi olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda GSBL üreten 119 *E. coli* suşunun 59'unda Sınıf 1 integron, 3'ünde de Sınıf 2 integron varlığı tespit edildi. Yirmi beş *Klebsiella* spp. izolatından ise 9'unda Sınıf 1 integron saptandı. Çalışmamızda saptanan integronların sekans analizi yapılarak içeriklerinin belirlenmesi, korezistansın aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Yüz on dokuz *E. coli* ve 25 *Klebsiella* spp. izolatı incelendiğinde sadece 17 izolatta *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerinden biri vardı. İzolatların büyük çoğunluğu birden fazla β -laktamaz geni içeriyordu. Bu sonuç göstermektedir ki direncin yayılımı yeterli kontrol önlemi alınmadığı sürece devam edecektir. Bir *E. coli* izolatında *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerinden hiçbiri saptanmadı. Bu veri diğer GSBL üreten genlerin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Belirlenen genlerin sekans analizi ile doğrulanması ve direnç geninin tiplendirilmesi epidemiyolojik olarak aydınlatıcı olacaktır.

GSBL üretiminin özellikle hastane enfeksiyonlarında önemi gittikçe artmaktadır. Bu da tedavide zamanı ve maliyeti artırmaktadır. Ayrıca sağlık çalışanlarının iş gücü kaybına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra daha da önemlisi hastane enfeksiyonları ölümlerle sonlanabilmektedir.

GSBL-pozitif bakteri enfeksiyonlarını sınırlandırmak amacıyla uygun ve akılcı antibiyotik kullanımının ülke genelinde bir sağlık politikası haline getirilmesi gerekmektedir. Hastane ortamında GSBL oluşturan bakteri kolonizasyonu veya enfeksiyonunun olması izolasyon yöntemlerinin dikkatle yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Dirençli suşlara bağlı enfeksiyonların hastalar arasında yayılmasında en önemli faktörün sağlık personelinin elleri olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca invaziv girişimlerde kullanılan araçlar, her türlü alet ve malzemenin de GSBL pozitif bakterilerin taşınmasında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu taşınmanın engellenmesi amacıyla el yıkama alışkanlığının edinilmesi, alkol bazlı el antiseptiklerin kullanımı, aletlerin, yüzeylerin sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda titiz ve bilgili hareket edilmesi önemlidir.

Bu çalışma bölgemizde GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} gen prevalansının belirlendiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Direncin yayılımının takibinde veri tabanı oluşturacaktır.

7. ÖZET

Genişlemiş-Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Beta Laktamaz Direncinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması

GSBL üretiminin özellikle hastane enfeksiyonlarında önemi gittikçe artmaktadır. Tedavide zaman ve maliyeti artırmasının yanında mortalite oranlarını da yükseltmektedir. Ayrıca sağlık çalışanlarında iş gücü kaybına neden olmaktadır.

Bu çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'ne yaklaşık 4 ay boyunca gelen 5057 idrar örneğinden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarından GSBL üreten 119 *E. coli*, 22 *K. pneumoniae* ve 3 *K. oxytoca* izolatının β -laktamaz enzim direnci ve integron içeriği araştırıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genleri ile Sınıf 1 ve 2 integron varlığı araştırıldı.

GSBL pozitifliği *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında %24.8'i olarak belirlendi. 119 GSBL pozitif *E. coli* izolatının *bla*_{TEM} oranı %61.3 ve *bla*_{OXA} gen varlığının %58.8 olduğu saptandı. Bu suşlarda en yaygın gen prevalansının %98.3 oranında *bla*_{CTX-M} olduğu görüldü. Çalışmamızda *E. coli* suşlarında *bla*_{SHV} genine ise rastlanmadı. *Klebsiella* spp. izolatlarında ise baskın olan genin %84 oranında *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} olduğu saptandı.

Ayrıca *bla*_{TEM} oranı %20, *bla*_{OXA} oranı ise %36 olarak bulundu. *E. coli* izolatlarında olduğu gibi *Klebsiella* spp. izolatlarında da baskın olan genin CTX-M olduğu saptandı (%84).

Çalışmamızda GSBL üreten 119 *E. coli* suşunun 59'unda Sınıf 1 integron, 3'ünde de Sınıf 2 integron varlığı tespit edildi. Yirmi beş *Klebsiella* spp. izolatından ise 9'unda Sınıf 1 integron saptandı.

Bu sonuçlar bölgemizde başta CTX-M olmak üzere direnç genlerinin *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında yoğun olarak bulunduğunu ve tedavinin mutlaka antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre planlanmasının önemini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: GSBL, *E. coli*, *Klebsiella* spp., β -laktamaz

8. SUMMARY

Investigation of Beta Lactamase Resistance in Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates with Polimerase Chain Reaction

The importance of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) production has increased, especially in nosocomial infections. In addition to increase time and cost of therapies, it also gives rise to higher mortality values.

In this study, prevalence of some β -lactamase enzyme genes and integron content in ESBL producing 119 *Escherichia coli*, 22 *Klebsiella pneumoniae* and 3 *Klebsiella oxytoca* isolates among 5057 urine samples admitted within four months in KTU School of Medicine, Farabi Hospital, Bacteriology Laboratories in Department of Medical Microbiology were investigated.

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA} genes and presence of class 1 and class 2 integrons were studied with polymerase chain reaction (PCR) method.

ESBL positivity rate was determined as 24.8% in all *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates. Prevalence of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA} genes in 119 ESBL positive *E. coli* strains was 61.3%, 98.3% and, 58.8%, respectively while no *bla*_{SHV} gene was detected. The most prevalent gene was *bla*_{CTX-M} among *E. coli* isolates. In our study, *bla*_{SHV} gene was not detected in *E. coli* strains.

In *Klebsiella* spp. isolates, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes were detected dominantly with 84% ratio. In addition, *bla*_{TEM} ratio was determined 20% while *bla*_{OXA} was 36%. Similar to *E. coli* isolates, CTX-M was the dominant gene in *Klebsiella* spp. isolates (84%).

In this study, we detected class I integron in 59 and class II in 3 of 119 ESBL producing *E. coli* strains. Moreover, 9 of 25 *Klebsiella* spp. isolates had class I integron.

These results show that resistance genes, particularly CTX-M, are intense among *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates in our region and emphasize the importance of true choice of antibiotic in treatment of *E. coli* and *Klebsiella* spp. infections and, of infection control programs.

Key Words: ESBL, *E. coli*, *Klebsiella* spp., β -lactamase

9. KAYNAKLAR

1. Laupland, K.B., Ross, T., Pitout, J.D., Church, D.L., Gregson D.B.: Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection*, 35(3): 150–153, 2007.
2. Edwards, J.R., Peterson, K.D., Mu, Y et al.: National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008. *Am J Infect Control*, 37(10): 783–805, 2009.
3. Al-Hasan, M.N., Eckel-Passow, J.E., Baddour, L.M.: Bacteremia complicating gram-negative urinary tract infections: a population-based study. *J Infect*, 60(4): 278–285, 2010.
4. Foxman, B.: The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.*, 7(12): 653-60, 2010.
5. Wagenlehner, F.M., Vahlensieck, W., Watermann, D., Weidner, W., Naber, K.G.: Uncomplicated urinary tract infection and treatment. *Aktuelle Urol*, 42(1): 33-7, 2011.
6. Kothari, A., Sagar, V.: Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: a multicenter study. *Infect Developing Countries*, 2(5): 354-358, 2008.
7. Yılmaz, N., Agus, N., Yurtsever, S.G., Pullukçu, H., Gülay, Z., Coşkuner, A., Köse, Ş., Aydemir, Ş., Gülenç, N., Özgenç, O.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in outpatient urinary isolates in Izmir, Turkey. *Med Sci Monit*, 15(11): PI61-65, 2009.
8. Bradford, P.: Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14(4): 933-51, 2001.
9. Özkan Ç., Oldacay M., Erdem G.: Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı. *Ankem Dergisi*, 16(1), 65-68, 2002

10. Lim, K.T., Yasin, R., Yeo, C.C., Puthuchery, S., Thong, K.L.: Characterization of Multidrug Resistant ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Malaysia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 165637, 10 pages, 2009.
11. Khanfar, H.S., Bindayna, K.M., Senok, A.C., Botta, G.A.: Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries*, 3(4): 295-299, 2009.
12. Fincancı, M., Ulutürk, R., Eren, G., Konuksal, C., Soysal, F., Sander, S., Boztaş, Z.: *Klebsiella pneumoniae* , *Klebsiella oxytoca* ve *Escherichia coli* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların araştırılmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 17 (1): 55-60, 2003.
13. Goyal, A., Prasad, K.N., Prasad, A., Gupta, S., Ghoshal, U., Ayyagari, A.: Extended spectrum β - lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res*, pp 695-700, 2009.
14. Bal, Ç.: Beta-laktamazlar: Güncel durum, *Flora*, 8(2): 111-23, 2003.
15. Onnberg, A., Mölling, P., Zimmermann, J., Söderquist, B.: Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS*, 119(4-5): 287-95,2011.
16. Kayaalp, S.O : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Hacettepe-Taş, Ankara, 2000, s. 200-238.
17. Ayaz, C. : Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Willke-Topçu A, Söyletir G, Doganay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008, s. 266-78.
18. Jehl, F., Chomarar, M., Weber, M., Gerard, A.: Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye. Biomerieux Yayınları, 2004.
19. Wagenlehner, F.M, Wagenlehner, C., Naber, K.G, Weidner, W.: Current Anti-Infective Treatment of Bacterial Urinary Tract Infections. *Mini Rev Med Chem.*, 8(8): 790-5, 2008.

20. Foxman, B.: The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.*, 7, 653–660, 2010.
21. Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S.: *Bailey&Scott’s Diagnostic Microbiology Elevent Edition*
22. Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M.: Enterobacteriaceae. “Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology ”. pp. 362-387, 1994.
23. Bilgehan H. Enterobacteriaceae. “Klinik Mikrobiyolojik Tanı”. Fakülteler Kitabevi, Ankara, 1992, s. 387-411.
24. Ryan, K.J.: Enterobacteriaceae. “Sherris medical Microbiology (an Introduction to Infectious Diseases)”. Prentice-Hall International, Montreal, 1994, pp. 323-29.
25. Bilgehan H.: Enterobacteriaceae Familyası. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları Kitabı, İzmir, 2000, s. 1-103.
26. Echeverria, P., Sethabutr, O., Pitarangsi, C.: Microbiology and Diagnosis of Infections with Shigella and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Dis*, 13: 220-225, 1991.
27. Vial, P.A., Browne, R., Lior, H.: Characterization of Enteroadherent Aggregative *Escherichia coli*, a Putative Agent of Diarrheal Disease. *JID*, 158: 70-79, 1998.
28. Ewing, W.H.: The Genus Klebsiella. Identification of Enterobacteriaceae, Inc Fourth Edition, Elsevier Science Publishing Co., New York, Amsterdam, 1986, pp. 365-380
29. Rippin, K. P., W. C. Stinson, J. Eisenstadt ve J. A. Washington. Clinical evaluation of the slide centrifuge (cytospin) Gram’s stained smear for the detection of bacteriuria and comparison with the Filtracheck-UTI and UTIscreen. *Am. J. Clin. Pahol.* 103: 316-319, 1995.
30. Winquist, A. G., M. A. Orrico ve L. R. Peterson. Evaluation of the cytocentrifuge Gram stain as a screening test for bacteriuria in specimens from from specific patient populations. *Am. J. Clin. Pathol.* 108: 515-524, 1997.
31. Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A.: Klinik Mikrobiyoloji (Çev. A. Başustaoğlu). Atlas Kitapçılık, s: 323-325, 2009.
32. Woodford, H. J., George, J.: Diagnosis and management of urinary infections in older people. *Clinical Medicine*, Vol 11, No 1: 80–3, 2011.

- 33.** Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, C.H., Moon, D.C., Lee, W.K., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Lee, J.C.: Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5), 639– 644, 2005.
- 34.** Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J., Cisneros, J.M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J.P., Tórtola, T., Mirelis, B., Navarro, G., Cuenca, M., Esteve, M., Peña, C., Llanos, A.C., Cantón, R., Pascual, A.: *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum b-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother.*, 63(4): 781-4, 2009.
- 35.** Song, S., Lee, E.Y., Koh, E.M., Ha, H.S., Jeong, H.J., Bae, I.K., Jeong, S.H.: Antibiotic Resistance Mechanisms of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Specimens. *Korean J Lab Med*, 29: 17-24, 2009.
- 36.** Kayaalp, S.O : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Hacettepe-Taş, Ankara, 2000, s. 200-238.
- 37.** Ayaz, C.: Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitap evleri, İstanbul, 2008: s. 266-78.
- 38.** Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A.: Klinik Mikrobiyoloji (Çev. A. Başustaoğlu). Atlas Kitapçılık, s: 1077-1083; 2009.
- 39.** Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: Medical Microbiology, (Çev. A. Başustaoğlu). Atlas Yayıncılık, s: 199-204; 2010.
- 40.** Crichlow, G.V., Kuzin, A.P., Nukaga, M., Mayama, K., Sawai, T., Knox, J.R.: Structure of the extended-spectrum class C beta lactamase of *Enterobacter cloacae* GC1, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion. *Biochemistry*, 38: 10256-10261, 1999.
- 41.** Jehl, F., Chomar, M., Weber, M., Gerard, A.: Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye. Biomerieux Yayınları, 2004.
- 42.** Leung-Kei, S.: Antibiotics: action and resistance in gram negative bacteria. *J Microbiol Immunol Infect*, 35: 1-11, 2002.

43. Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A.: What's new in antibiotic resistance? Focus on beta lactamases. *Drug Resistance Updates* 9, 142–156, 2006.
44. Winn, S., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckeberger, G., Koneman, E.: Antimicrobial susceptibility testing. 8th edition. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, United States of America, 2006, Lippincott Williams&Wilkins, Chapter 17, p. 945-963.
45. Forbes, A., Sahm, F., Weissfeld, S.: Principles of antimicrobial action and resistance, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* 11th edition, 2003, St. Louis, CV Mosby Co, Chapter 15, p. 214-220.
46. Ananthan, S., Subha, A.: Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol*, 23(1), 20-3, 2005.
47. Schwarz, S., Cloeckaert, A., Roberts M.C.: Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aa, restrup F. M. (eds.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, , Washington D. C., pp.73-98, 2006.
48. Guerra, B., Soto, S., Cal, S. Mendoza, M.C.: Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2166-2169, 2000.
49. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. Threlfall, E.J.: Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63: 219-228, 2005.
50. Gür, D.: Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç, Ed: Topçu W.A, Söyletir G., Doğanay M.: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevi, 2002, 182-192.
51. Yüce A.: Antibiyotik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *KLİMİK Dergisi*, 2001, 14(2): 41-46.
52. Waturangi, D. E., Schwarz, S., Suwanto, A., Kehrenberg, C., Erdelen, W.: Identification of a truncated Tn1721-like transposon located on a small plasmid of *Escherichia coli* isolated from *Varanus indicus*. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50:86-89, 2003.

- 53.** Nebbia, P., Tramuta, C., Giammarino, M., Ambrog, C. et al.: Antimicrobial resistance, class 1 and 2 integrons and gene cassettes in avian *Escherichia coli*. *Ital. J. Anim.*, **7**, 391-395, 2008.
- 54.** Recchia, G.D. Hall, R.M.: Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, **141**: 3015-3027, 1995.
- 55.** Carattoli, A.: Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, **32**: 243-259, 2001.
- 56.** Rowe-Magnus, D.A. Mazel, D.: The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, **292**: 115-125, 2002.
- 57.** Mazel, D.: Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews Microbiology*, **4**: 608-620, 2006.
- 58.** Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B. et al : Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob Chemother.*, **52**, 489–492, 2003.
- 59.** Leverstein-van Hall, M.A., Blok, H.E.M., Donders, A.R.T., Paauw, A. et al.: Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis.*, **187**, 251–259, 2003.
- 60.** Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H. et al.: A novel integron-like element carrying the metallo-beta lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.*, **39**, 1612-1615, 1995.
- 61.** Partridge, S.R., Brown, H.J., Stokes, H.W. Hall, R.M.: Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1263-1270, 2001.
- 62.** Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R.: Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology*, **183**: 5725-5732, 2001.

63. Carattoli, A.: Importance of integrons in the diffusion of resistance Vet. Res. 32, 243–259, EDP Sciences, 2001.
64. Medeiros, A.A.: Cooperative evolution of mechanisms of beta-lactam resistance. Clin Microbiol Infect., 6 (Suppl3): 3-5, 2000.
65. Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A.: Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended spectrum beta-lactamases. Res Microbiol., 155(6): 409-21, 2004.
66. xa.yimg.com/kq/groups/14911969/1338927718/name/Dr.Oya+ESBL.ppt
67. Tanır, G., Göl, N. : Antibiyotik direnci. KLİMİK Dergisi., 12(2), 47-54, 1999.
68. Altınkanat G.: Rutin laboratuvarımızda izole edilen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Enterobacter cloacae* kökenlerinde, yeni geniş spektrumlu beta laktamaz IBC-1'in fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D, İstanbul, 2006
69. Bush, K., Jacoby, G.A.: Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother., 54(3): 969-76, 2010.
70. Livermore, D.M.: Detection of beta-lactamase mediated resistance. J Antimicrob Chemother., 48 (Suppl 1): 59-64, 2001.
71. Livermore, D.M.: β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Microbiology reviews., p. 557–584, 1995.
72. Gülay, Z.: Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, (5): 210-229, 2001.
73. Gür, D.: GSBL'lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004.
74. Canto'n, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M.: Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect, 14(Suppl. 1), 144–153, 2008.

- 75.** Samaha-Kfoury, J.N., Araj, G.F.: Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*, 327: 1209–13, 2003.
- 76.** Demir N.: Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (gsbl) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hast., İstanbul 2006.
- 77.** Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James D., Johnson, A.P., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, J.B., Loughrey, A., Lowes, J.A., Warren, R.E., Livermore, D.M.: Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.*, 54(4): 735-43, 2004.
- 78.** Bonnet R.: Growing group of extended spektrum beta lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemother* , 48 : 1-14, 2004
- 79.** Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211–1233, 1995.
- 80.** Cantón, R., Morosini, M.I., de la Maza, O.M., de la Pedrosa, E.G.: IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.*,14 Suppl 1: 53-62, 2008.
- 81.** Akova, M.: Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Var! *ANKEM Derg.*18 (Ek 2): 98-103, 2004.
- 82.** Gür, D.: Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Ondokuzuncu Bilgi Eki. Bilimsel Tıp Yayınevi, No:4, Ankara, 2009.
- 83.** Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement M100-S16 CLSI Pennsylvania, USA 2006.
- 84.** Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff,W., Jarlier, V.: Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.*,14 Suppl 1: 90-103, 2008.

- 85.** Paterson, D.L., Bonomo, R.: Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.*; 18(4): 657-86, 2005.
- 86.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S16. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.
- 87.** Stürenburg, E., Mack, D.: Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect.* 47(4): 273-95, 2003.
- 88.** Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.*, 155, 335-350, 1987.
- 89.** Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas R.M.: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications, *Crt. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 301-334, 1991.
- 90.** Erlich, H.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.: Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science*, 252, 1643-1645, 1991.
- 91.** Pershing, D.H., *In vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*, Pershing D.H, Smith, T.F., Tenover, F.C. (eds), American Society for Microbiology, Washington D.C.,51, 1993.
- 92.** Arlet, G., Philippon, A.: Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM,SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Letts.*, 82: 19-26, 1991.
- 93.** Dutour, C., Bonnet, R., Marchandin, H., Boyer, M., Chanal, C., Sirot, D., Sirot, J.: CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -Lactamases from Enterobacteriaceae Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46(2): 534-7, 2002.
- 94.** Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P.H.: PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 39(1): 185-91, 1995.
- 95.** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

96. Drago, L., Mombelli, B., De Vecchi, E., Tocalli, L., Nardi, G., Gismondo, M.R.: Epidemiology of Gram-negative antibiotic resistance in outpatients: a year of surveillance. *Int J Antimicrob Agents.*, 16(4): 479-81, 2000.
97. Falagas, M.E., Karageorgopoulos D.E.: Extended-spectrum b-lactamase-producing organisms. *Journal of Hospital Infection*, 73, 345-354, 2009
98. Öktem, İ.M.İ., Gülay, Z., Biçmen M., Gür D., The Hitit Project Study Group.: qnr prevalence in ESBL positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn. J Infection Dis.*, 61, 13-17, 2008.
99. Livermore, D.M., Warner, M., Mushtaq, S., Doumith, M., Zhang, J., Woodford, N.: What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 415–419, 2011.
100. Özgümiş, O.B., Tosun, İ., Aydın, F., Kılıç, A.O.: Horizontal dissemination of TEM- and SHV-typr beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Braz. J. Microbiol.* vol.39 no.4 São Paulo Dec, 2008.
101. Deveci, Ö., Yula, E., Tekin A. : Frequency of extended spectrum beta-lactamase and resistance to antibiotics in *Escherichia coli* strains isolated from urinary cultures. *Journal of Clinical and Experimental Investigations, Klin Den Ar Derg.*, 1(3): 182-186, 2010.
102. Bali, E.B., Açık, L., Sultan, N.: Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (8), pp. 650-654, 2010.
103. Albayrak, N., Kaya, Ş.: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimleri ve antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 39 (1-2): 16-21, 2009.
104. Eryılmaz, M., Bozkurt, M.E., Yıldız, M.M., Akın A.: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığının araştırılması. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14: 10-12, 2010.

- 105.** Karlı, Ş., Ceran, N., Genç, İ., İnan A., Öztürk, D., Taşdemir, C., Uzun, B., Aksaray, S., Göktaş, P.: Toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen gsbl pozitif *Escherichia coli* suşlarında tigesiklin duyarlılığının araştırılması. ANKEM Derg, 24(4): 209-214, 2010.
- 106.** Sturm, P.D.J., Bochum, E.T.M., Mook Vermulst, S.V.M., Handgraaf, C., Klaassen, T., Melchers, W.J.G.: Prevalence, Molecular Characterization, and Phenotypic Confirmation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in The Netherlands. Microbial Drug Resistance Volume 16, Number 1, 2010.
- 107.** Reinert, R.R., Low, D.E., Rossi, F., Zhang, X., Wattal, C., Dowzicky, M.J.: Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60, 1018–1029, 2007.
- 108.** Nazik, H., Öngen, B., Sarıkaya, A., Kuvat, N., İlkaç, M.: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Ko-rezistansı. Medsci, Cilt: 31, Sayı:2, 2011.
- 109.** Bozkurt, H., Kurtoglu, M.G., Aygül, K., Bayram, Y., Berktaş, M.: Nozokomiyal Kaynaklı *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında Genisletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi. Turkish Medical Journal, 1: 150-153, 2007.
- 110.** Yazıcı, Y., Aydın, F., Tosun, İ., Kaklıkkaya, N., Çaylan, R., Köksal, İ.: Klinik Örneklerden İzole Edilen *Enterobacter* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 34: 29-32, 2004.
- 111.** Akhtar, N.: Hospital acquired infections in a medical intensive care unit. J Coll Physicians Surg Pak., 20(6): 386-90, 2010.
- 112.** Işık, F., Arslan, U., Tuncer, İ.: Klinik örneklerden soyutlanan *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve antibiyotik duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi, 21(1): 33-38, 2007.
- 113.** Öksüz, L., Gürler, N.: *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. Mikrobiyol Bul, 43: 183-194, 2009.

- 114.** Öztel Ocak, H., Gövce, E., Dinç, U., Akıneden, A., Bayramoğlu, G., Buruk, G., Kaklıkkaya, N.: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2006-2007 yılları arasında polikliniklerden gelen idrar örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılık oranlarının değerlendirilmesi. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, s: 684, 2008.
- 115.** Nazik, H., Öngen, B., Sarıkaya, A., Kuvat, N., İlktaç, M.: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Ko-rezistansı. Medsci, Cilt: 31, Sayı:2, 2011.
- 116.** Al Hashem, G., Al Sweih, N., Jamal, W., Rotimi, V.O.: Sequence analysis of bla(CTX-M) genes carried by clinically significant *Escherichia coli* isolates in Kuwait hospitals. Med Princ Pract., 20(3): 213-9, 2011.
- 117.** Hoşoğlu, S., Gündeş, S., Kolaylı, F., Demirdağ, K., Günaydın, M., Altındış, M., Çaylan, R., Uçmak, H.: Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. Indian Journal of Medical Microbiology, 25(4): 346-50, 2007.
- 118.** Sharma, J., Sharma, M., Ray, P.: Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. Indian J Med Res 132, pp 332-336, 2010.
- 119.** Peirano, G., Greune, Cornelius H.J., Pitout, J.D.: Characteristics of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 69, 449–453, 2011.
- 120.** Huemer, H.P., Eigentler, A., Aschbacher, R., Larcher, C.: Dominance of CTX-M group 1 beta-lactamase enzymes in ESBL producing *E. coli* from outpatient urines in neighboring regions of Austria and Italy. Wien Klin Wochenschr 123: 41–44, 2011
- 121.** Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R.: Increasing prevalence of ESBL - producing Enterobacteriaceae in Europe. EURO SURVEILLANCE Vol. 13, Issue 47, 2008.
- 122.** Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Strachounski, L.: Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing

Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 3724–3732, 2003.

123. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P.: Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. , 48(1): 15-22, 2004.

124. Carrër, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, O.A., Feriha, C., Cuzon, G., Matar, G., Honderlick, P., Nordmann, P.: Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother., 54(3): 1369-73, 2010.

125. Sandallı, C., Buruk, K., sancaktar, M., Özgümüş, O.B.: Prevalence of integrons and a new *dfra17* variant in Gram-negative bacilli which cause community-acquired infections. Microbiology and Immunology volume 54, Issue 3, p: 164-169, 2010

126. Rao, A.N., Barlow, M., Clark, L.A., Boring, J.R., Tenover, F.C., McGowan, J.E.: Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US Hospitals. Emerging Infectious Diseases, Vol. 12, No. 6, 2006.

127. White, P., McIver, C.J., Rawlinson, W.D.: Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 2658-2661, Vol. 45, No. 9, 2001.

128. Dağlar, D., Ongüt, G., Oğünç, D., Ozhak Baysan, B., Demirbakan, H., Sepin Özen, N., Gültekin, M.: Investigation of ESBL types in community acquired urinary *Escherichia coli* isolates by isoelectric focusing and polymerase chain reaction. Mikrobiyol Bul., 44(3): 367-374, 2010.

129. Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D., Agostini, M.O., Christianson, S., Simor, A.E., Paton, S., The Canadian Hospital Epidemiology Committee of The Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program.: Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 1204-1214, 2004.

130. Kusum, M., Wongwanich, S., Dhiraputra, C., Pongpech, P., Naenna, P.: Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital, Thailand. J Med Assoc Thai., 87(9): 1029-33, 2004.

131. Ode, T., Saito, R., Kumita W., Sato, K., Okugawa, S., Moriya, K., Koike, K., Okamura, K.: Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 347-350, 2009.

ÖZGEÇMİŐ

1984 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra, 2003-2004 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Rize Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında aynı bölümden "Biyolog" ünvanı ile mezun oldu. 2008-2009 öğretim yılında KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. 2009 yılında aynı enstitüye bağlı bölümde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Hala aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak devam etmektedir.

Ahu KAMBUROĞLU