

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE VE ESCHERICHIA
COLI SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ
GENLERİNİN KLONLANMASI***

HİHAL ÖZKUL

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE VE ESCHERICHIA
COLI SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ
GENLERİNİN KLONLANMASI***

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HİLAL ÖZKUL

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. Zeynep GÜLAY**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü Tarafından
2005.KB.SAG.073 sayı ile desteklenmiştir

TEŐEKKÖR

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezime büyük katkı sağlayan sayın danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Gülay'a, eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma ve desteklerinden dolayı arkadaşlarıma ve anneme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tablo Dizini	iii
Şekil Dizini	iv
Kısaltmalar	vi
1. ÖZET	1
2.SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler Ve Etki Mekanizmaları	6
4.2. Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Gelişimi	7
4.3. Beta-Laktamaz Yapısı Ve Sınıflandırılması	7
4.3.1. A Sınıfı Beta-Laktamazlar	9
4.3.1.1. TEM ve SHV Türevi Grup A Enzimler	10
4.3.1.2. TEM ve SHV Dışı Grup A Genişlemiş Spektrumlu Enzimler	11
4.3.2. B Sınıfı Beta- Laktamazlar	13
4.3.3. C Sınıfı Beta- Laktamazlar	14
4.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar	16
4.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayılım Yolları.....	17
4.4.1. Transformasyon	17
4.4.2. Transdüksiyon.....	17
4.4.3. Konjugasyon	18
4.4.4. Hareketli Elemanlar.....	21
4.4.4.1. Plazmidler	21
4.4.4.2. <i>Transpozonlar ve Katılım Dizileri (IS=Insertion Sequences)</i>	22
4.4.4.3. <i>İntegronlar</i>	23
4.5. Beta-laktamazların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	23
4.5.1. Fenotipik Tarama Ve Doğrulama Testleri	24
4.5.1.1. <i>Klavulanik Asit İçeren Kombinasyon Disklerinin Kullanımı</i>	25
4.5.1.2. <i>Çift Disk Sinerji Yöntemi</i>	25
4.5.1.3. <i>E test Yöntemi</i>	25
4.5.1.4. <i>Fenotipik GSBL Testlerinin Sorunları</i>	25
4.5.1.5. <i>İzoelektrik Odaklama</i>	26
4.5.2. Moleküler Yöntemler	26
4.5.2.1 <i>Oligotiplendirme</i>	26
4.5.2.2 <i>PZR</i>	27
4.5.2.3 <i>PZR-SSCP</i>	27
4.5.2.4 <i>PZR-REA (Restriksiyon Enzim Analizi= Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))</i>	27
4.5.2.5 <i>Klonlama ve Dizi Analizi</i>	27
4.6. GEN KLONLAMA.....	28
4.6.1. Vektörler	28
4.6.1.1. <i>Plazmid Vektörler</i>	29
4.6.2. Klonlama Yöntemleri	30
4.6.2.1. <i>Yapışkan Uçlu "Sticky-end" Klonlama</i>	31
4.6.2.2. <i>Küt Uçlu "Blunt-end" Klonlama</i>	32
4.6.2.3. <i>T/A Klonlama</i>	32
4.6.3. Rekombinant Molekülü Taşıyan Konak Hücrelerin Seçilmesi	35

4.6.3.1. Koloni Seçimi	35
4.6.4. Klonlanmış Genin Nükleotid Dizisinin Saptanması	36
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
5.1. İzolatlar	38
5.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri.....	38
5.3. PZR Ve Dizi Analizi İçin Kullanılan Öncüller.....	40
5.4. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Üretimini Saptanması.....	41
5.5. GSBL'lerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Saptanması.....	41
5.5.1. DNA Eldesi.....	41
5.5.2 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması.....	42
1.1.1. 5.5.3 Agaroz Jel Elektroforezi ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	45
5.6. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	45
5.7. PZR Ürününün Klonlanması	46
5.7.1. Ligasyon	48
5.7.2. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	49
5.7.3. Transformasyon İşlemi	49
5.7.3.1. Kompetan Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması.....	49
5.7.3.2. Bakteri Kültüründen Bakterilerin Hazırlanması.....	49
5.7.3.3. Transformasyon İçin Gerekli Besiyerlerinin Hazırlanması.....	49
5.7.3.4. Transformasyon.....	49
5.7.3.5 Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi	50
5.7.4 Klonlanmanın Doğrulanması Amacıyla Kolonilerden PZR ile <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} 'nin Saptanması.....	51
5.8. Plazmid DNA Eldesi	51
5.9. Klonlardan M13F-pUC-F, M13F-pUC-R Primerleri ile PZR.....	53
5.9.1. M13 PZR	53
5.10. DNA Dizi Analizi	54
6. BULGULAR	55
6.1. Kombine Disk Yönteminin Sonuçları	55
6.2. PZR Sonuçları.....	55
6.3. PZR Ürünlerinin Klonlanması	56
6.3.1. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçilmesi	56
6.3.2. Transformasyon Verimliliği.....	56
6.3.3. Klonlanmanın Doğrulanması Amacıyla Kolonilerden PZR ile <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} 'nin Saptanması.....	57
6.4. Klonlardan Elde Edilen Plazmidlerin <i>bla</i> Gen Ürünleri Açısından İncelenmesi	58
6.5. Klonlardan M13F-pUC-F, M13F-pUC-R Primerleri ile PZR.....	63
6.6. DNA Dizi Analizi	64
6.6.1. CTX-M Klonları.....	64
6.6.2. SHV Klonları	67
6.6.3. TEM Klonları.....	70
7. TARTIŞMA	74
8. KAYNAKLAR.....	79

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazların sınıflandırılması	8
Tablo 2. GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zon değerleri	24
Tablo 3. PZR analizi için kullanılan öncüller	40
Tablo 4. Dizi analizi için kullanılan öncüller	41
Tablo 5. PZR sonucu CTX-M, SHV ve TEM pozitif olan suşlar	55
Tablo 6. Transformasyon verimliliği	56
Tablo 7. CTX-M dizi analizi için kullanılan öncüller	64
Tablo 8. SHV dizi analizi için kullanılan öncüller	67
Tablo 9. TEM dizi analizi için kullanılan öncüller	70
Tablo 10. Dizi analizi sonuçlarına göre GSBL tipleri	73

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Beta-laktam ajanların kimyasal yapısı	6
Şekil 2. Konjugasyon işlemi ile plazmid DNA'nın transferi	19
Şekil 3. a) <i>E. coli</i> F plazmidinin genetik haritası. b) Tipik bir R plazmidi	20
Şekil 4. F plazmidinin kromozoma girişi	21
Şekil 5. Transpozisyon yapabilen elemanlardan IS2 ve Tn5	22
Şekil 6. pTZ57R/T plazmidi	30
Şekil 7. EcoR1 Restriksiyon enzim kesimi	31
Şekil 8. Restriksiyon enzim kesimi	32
Şekil 9. A uzantısına sahip çift iplikli PZR ürünü ile T uzantılı vektör	33
Şekil 10. TA klonlamanın şematik olarak aşamaları	34
Şekil 11. pTZ57R Klonlama Vektörü	47
Şekil 12. GSBL paterni gösteren bir <i>K. pneumoniae</i> suşu	55
Şekil 13. Mavi ve beyaz kolonilerin görünümü	
Şekil 14. 66-23, 94-10 numaralı klonların CTX-M-1 PZR sonrası bant görüntüleri	56
Şekil 15. 91-3, 94-7 numaralı klonların TEM PZR jel görüntüsü.	57
Şekil 16. 200-1, 155-2 numaralı klonların SHV PZR jel görüntüsü	58
Şekil 17. plazmid DNA/CTX-M	59
Şekil 18. plazmid DNA/SHV	60
Şekil 19. plazmid DNA/TEM	60
Şekil 20. CTX-M-1 PZR jel görüntüsü	61
Şekil 21. SHV PZR jel görüntüsü	61
Şekil 22. TEM PCR jel görüntüsü	62
Şekil 23. plazmid DNA/ TEM	62
Şekil 24. TEM PZR jel görüntüsü	62
Şekil 25. plazmid DNA/ CTX-M	63
Şekil 26. M13 PZR jel görüntüsü	63
Şekil 27. 66-23 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	64
Şekil 28. 94-10 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	65
Şekil 29. <i>E. coli</i> <i>bla</i> _{CTX-M} gen bölgesi için iki çalışma suşu ve yedi GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin CTX-M-1 dizisine göre hizalanmış şekli	66

Şekil 30. <i>E. coli</i> klonlarından izole edilen CTX-M beta-laktamaz enzimine ait 876 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç	67
Şekil 31. 155-2 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	68
Şekil 32. 200-1 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	68
Şekil 33. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli bla_{SHV}</i> gen bölgesi için iki çalışma suşu ve dört GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin SHV-1 dizisine göre hizalanmış şekli	69
Şekil 34. <i>K. pneumoniae</i> klonlarından izole edilen SHV beta-laktamaz enzimine ait 861 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç	70
Şekil 35. 91-3 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	71
Şekil 36. 94-7 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi	72
Şekil 37. <i>E. coli bla_{TEM}</i> gen bölgesi için iki çalışma suşu ve iki GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin TEM-1 dizisine göre hizalanmış şekli	73
Şekil 38. <i>E. coli</i> klonlarından izole edilen TEM beta-laktamaz enzimine ait 861 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç	73

KISALTMALAR

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

Hfr: High frequency of recombination

IS: Insertion Sequences

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

IPTG: İzopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozid

X-Gal: 5-Bromo-4-kloro-3-indol beta-D-galaktozid

TBE: Tris-Borik asit-EDTA

LB: Luria Bertani

TB: Terrific Broth

CLSI: Clinical and Laboratory Standarts Institute

1. ÖZET

***Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Genlerinin Klonlanması**

Amaç: Bu çalışmada, kan kültürlerinde üretilmiş, fenotipik testler ve PZR ile farklı genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ürettiği belirlenmiş klinik *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarındaki *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* genlerinin klonlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 2004 yılında kan kültürlerinden izole edilen toplam 21 *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşu alındı. Suşlarda *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* varlığı PZR ile araştırıldı. Aralarından farklı GSBL'ler üreten altı izolat seçildi ve bu izolatlar klonlama çalışmalarına alındı. Klonlama için T/A klonlama yapan "InsTAclone™ PCR Cloning Kit" kullanıldı. Doğru genlerin klonlandığının anlaşılması amacıyla koloni PZR yapıldı. Klonlanan genin varlığını göstermek için dizi analizi öncesi klonlardan plazmid izolasyonu yapıldı. Seçilen suşlardan *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* genlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi için dizi analizi yaptırıldı.

Bulgular ve Sonuç: Çalışmaya alınan toplam 21 suşta GSBL pozitifliği saptandı. PZR sonucu CTX-M-1 pozitif olan suşların sayısı 18, TEM pozitif olan suşların sayısı 11, SHV pozitif olan suşların sayısı 9 olarak saptandı. Seçilen izolatlardaki *bla* genlerinin klonlanması sonucunda, PZR ürününü alan vektörlerde *lacZ* geni inaktive edildiği için LB agarda laktoz negatif, beyaz koloniler; PZR ürününü almayan vektörlerde ise laktoz pozitif mavi koloniler oluştu. Koloni PZR ile klonların aktarılan gen açısından pozitif olduğu bulundu. Dizi analizi sonuçlarına göre CTX-M klonlarında CTX-M-3 ve CTX-M-15, SHV klonlarında SHV-5 ve SHV-12 ve TEM klonlarında ise TEM-1 bulundu. Sonuçlarımıza göre GSBL üreten TEM klonlarının seçiminde başarısız olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Klonlama, GSBL, PZR

2.SUMMARY

Cloning of the Extended Spectrum Beta-lactamases of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains

Objective: To perform cloning of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes which are found in extended spectrum beta-lactamases *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from blood cultures.

Methods: Twenty one *K. pneumoniae* and *E. coli* strains isolated from blood cultures at Dokuz Eylul University Hospital in 2004 were taken in to the study. *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} presence was sought by PCR. Six isolates producing different ESBL types were selected among these isolates and these strains were taken in to the cloning studies. InsTAclone™ PCR Cloning Kit was used for T/A cloning. Colony PCR was performed to ascertain that the correct genes was cloned. Plasmid extraction was performed to reveal the presence of cloned genes before sequencing. Sequencing was performed on both strands to determine nucleotide sequences of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes from selected strains.

Results and Conclusion: ESBL pattern was detected in 21 strains in our study. According to the result of specific PCR for *bla* genes, eighteen isolates had *bla*_{CTX-M}, nine isolates had *bla*_{SHV} and eleven of them had *bla*_{TEM}. As a result of cloning, vectors with PCR product which had inactive *lacZ* gene produced lactose negative, lucid colonies on LB agar. On the other hand vectors without PCR product produced lactose positive, blue colonies on LB agar. Clones were found positive for the transferred genes. The sequence analysis revealed that; CTX-M-3 and CTX-M-15 were found in the CTX-M clones, SHV-5 and SHV-12 were found in the SHV clones and TEM-1 were found in the TEM clones. According to the results, there was a failure in selecting of TEM clones producing GSBL.

Key Words: Gene Cloning, ESBL, PCR

3. GİRİŞ VE AMAC

Gram negatif mikroorganizmalar hastane kaynaklı infeksiyonlar başta olmak üzere idrar yolu infeksiyonları, yara yeri infeksiyonları, pnömoni, bakteriyemi ve sepsis gibi ciddi klinik tablolara yol açmaktadır (1). Bu infeksiyonların tedavisinde genellikle beta laktam antibiyotikler tek başına veya diğer grup antibiyotiklerle kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda bu antibakteriyel ajanların yaygın kullanımına bağlı olarak beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları ve bu dirence bağlı tedavi başarısızlıkları artmaktadır (2,3). Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisi bakterilerin ürettiği beta-laktamaz enzimleridir (4).

Son yirmi yıllık dönemde birçok yeni beta-laktam antibiyotik geliştirilmiş ancak tedaviye giren her yeni antibiyotikle birlikte bu antibiyotiğe karşı dirence neden olan yeni beta-laktamaz grupları da ortaya çıkmıştır (5).

Enterik bakterilerde bulunan plazmid kaynaklı beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2 ve SHV-1) başlangıçta penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken sonraları bu enzimleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) adı verilen ve son kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır (6,7). GSBL'ler, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* başta olmak üzere sıklıkla *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülmektedir (8). Yapısal özellikler ve evrimsel ilişkiler açısından GSBL'ler TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES, OXA olmak üzere dokuz farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır (9). Ülkemizde *Enterobacteriaceae* üyelerinde en sık TEM, SHV, CTX-M tipi enzimler gözlenmektedir (10, 11, 12).

Beta-laktamazlar arasında CTX-M tipi GSBL'lerin prevalansı 1995'den beri hızla artmakta ve özellikle toplum kökenli *Enterobacteriaceae* üyelerinde giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

GSBL'lerin tanımlanması ve tiplendirilmesi ile ilgili en önemli sorun özellikle hastane kökenli izolatların birden fazla GSBL'yi aynı anda üretmeleridir (13,14). Bu nedenle antibiyogram, izoelektrik odaklama gibi fenotipik yöntemlerin sonuçlarıyla hangi tip GSBL'nin üretildiğine karar vermek hemen hemen imkansızdır (5,15,16). Oysa ki GSBL yayılımının engellenmesindeki ilk basamak toplum veya hastane kökenli izolatlarda hangi tip GSBL'nin hakim olduğu, yayılma hızı ve yollarının anlaşılmasıdır. Bunun için de öncelikle

izolatların içerdikleri GSBL tipleri doğru olarak tanımlanmalıdır. Son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin bu soruna büyük ölçüde çözüm getirmesine rağmen, tek basamaklı PZR ve ardından dizi analizi uygulaması aynı aileden birden fazla GSBL üretildiğinde yanlış veya yetersiz sonuç vermektedir. Bu nedenle de öncelikle bakterilerin ürettiği GSBL'lerin ayrılması gerekmektedir. Bu açıdan, beta laktamaz genlerinin klonlanması, ardından dizi analizi uygulanması yeğlenen yöntemdir.

Önceki yıllarda Dokuz Eylül Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda GSBL'ler ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu enzimlerin klonlanması ile ilgili çalışmalar henüz yapılmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında kan kültürlerinde üretilmiş, fenotipik testler ve PZR ile farklı genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ürettiği belirlenmiş klinik *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarındaki *bla_{ctx-m}* *bla_{tem}*, *bla_{shv}* genlerinin klonlanması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

Antibiyotik direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde giderek artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (17).

1939'da penisilinler saf olarak elde edilmiş ancak hemen ardından 1940'da Abraham ve Chain *E. coli*'de penisilini parçalayan penisilinazı bulmuştur. 1944 yılında, Kirby, *Staphylococcus aureus* suşlarında plazmid kaynaklı penisilinaz enzimini elde etmiştir (4,5). Ardından birçok yeni antibiyotik geliştirilmiş ancak bakteriler bulunan her antibiyotiğe farklı bir mekanizma ile direnç geliştirmeyi başarmıştır (5).

Beta-laktam antibiyotikler günümüzde infeksiyon tedavisinde en sık kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Ancak bu durum bu gruba karşı gelişen direnci de arttırmaktadır. Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncinde önde gelen mekanizma beta-laktamaz üretimidir (18).

Beta-laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidroliz eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimlerdir (4). Beta-laktamazlar arasında klinik açıdan en önemli grup genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır. Günümüze kadar 500'ü aşkın GSBL bildirilmiştir (19).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, sefamisinler hariç tüm sefalosporinleri, penisilinleri ve aztreonamı inaktive eden enzimlerdir (20). Bu beta-laktamazlar, Grup 2b'de yer alan ve penisilin türevleri ile dar spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları için bu şekilde adlandırılmaktadırlar. GSBL'ler Bush grup 2be'de yer almaktadır (Tablo-1). GSBL'ler klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Sefamisinler ve karbapenemler GSBL'lerden etkilenmezler (5).

GSBL'ler iki gruba ayrılmaktadır:

1-TEM ve SHV türevi GSBL'ler

2- TEM ve SHV dışı GSBL'ler (CTX-M ailesi, PER 1- 2, OXA ailesi, VEB-1, GES-1)

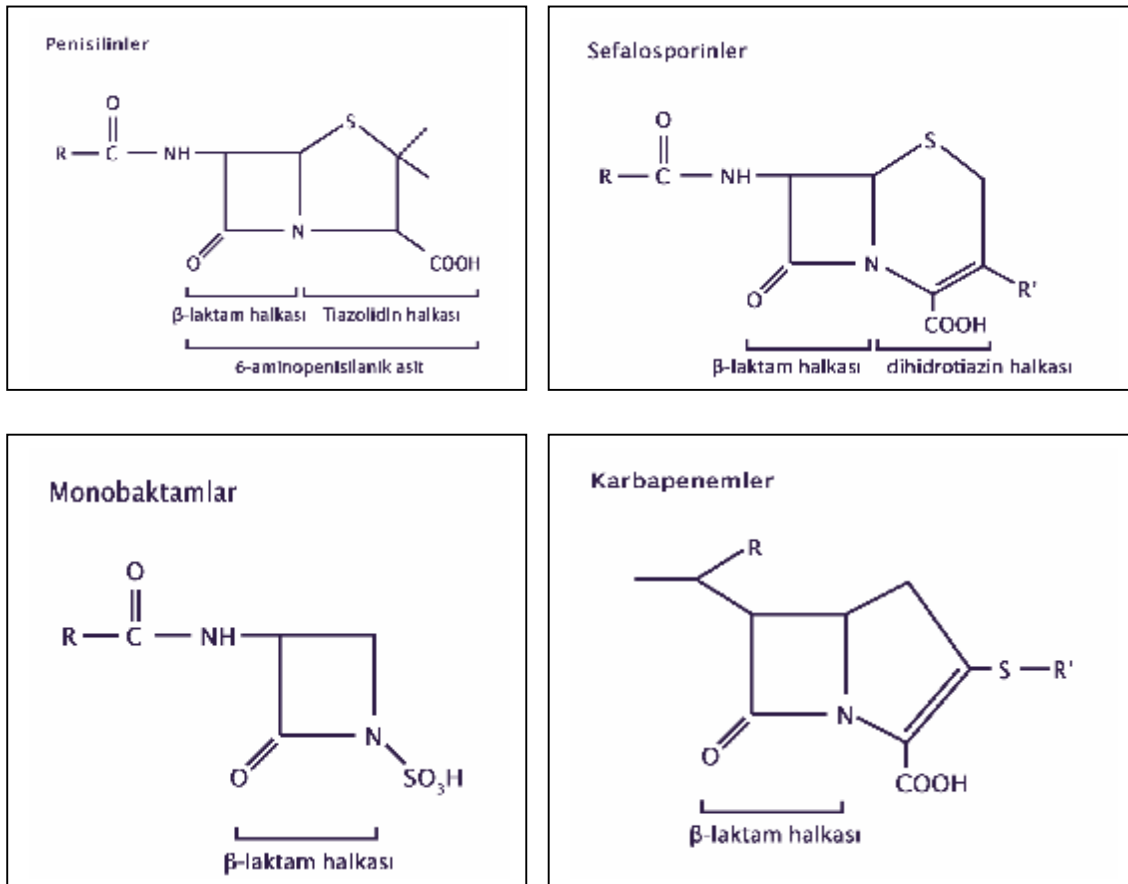
İlk GSBL 1983 yılında Almanya'da bir *K. pneumoniae* suşunda bildirilen SHV-2'dir (21). Günümüze kadar geçen yıllar içerisinde ise önce Avrupa ülkeleri, bunları takiben ABD ve Asya ülkelerinde farklı GSBL'ler üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşları bildirilmiştir (22).

Klinik izolatlar arasında GSBL prevalansı ve hakim GSBL tipi ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında değişmektedir (23).

4.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler Ve Etki Mekanizmaları

Beta-laktam grubu antibiyotikler (penisilin, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörleri) günümüzde özellikle hastane infeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Ancak bu durum bu gruba karşı gelişen direnci de arttırmaktadır (18).

Tüm beta-laktam antibiyotiklerde, dört üyeli ortak bir beta-laktam halkası bulunur. Monobaktamlar hariç bu halkaya ikinci bir halka eklenmiş durumdadır (Şekil 1) (24,25). Penisilin ve benzerlerinde bu iki halkalı yapıya 6-amino penisilanik asit (6-APA), sefalosporinlerde ise 7-amino sefalosporanik asit (7-ASA) adı verilir (Şekil 1) (24).



Şekil 1. Beta-laktam ajanların kimyasal yapısı (24)

Beta-laktam antibiyotikler hücre duvar sentezini inhibe eden bakterisidal ajanlardır (25). Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarında transpeptidasyonu engelleyerek peptidoglikan

sentezini inhibe ederler. Bu antibiyotikler yapısal benzerlikler nedeniyle transpeptidasyon işlemini yürüten enzimlere bağlanırlar. Bu enzimler penisiline ve benzeri beta-laktamazlara ilgilerinden dolayı Penisilin Bağlayan Protein (PBP) olarak adlandırılırlar. Beta-laktam ajanlarının bağlanması ile PBP'ler ve dolayısıyla peptidoglikan sentezinin son basamağı olan transpeptidasyon inhibe olur. Ayrıca antibiyotiğin etkisi ile bakteri hücrelerinde murein hidrolaz adı verilen otolitik enzimler de aktive olarak peptidoglikanı parçalarlar (26). Çeşitli beta-laktam ajanların bakteri hücresinde bulunan değişik PBP'lere olan afiniteleri farklıdır (27).

Beta-laktamaz inhibitörleri ise beta-laktamazlar ile birleşip, geri dönüşümsüz bir açıl-enzim kompleksi oluşturarak beta-laktamaz enziminin aktivitesini yok eder (26).

4.2. Beta–laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Gelişimi

Bakteriler dört temel yolla beta-laktam ajanların bakterisidal etkisinden korunurlar (24,28).

Bunlar;

1. Beta-laktam antibiyotiklerin hedefi olan penisilin bağlayan proteinlerdeki değişimler veya bakterinin düşük afiniteli yeni bir PBP yapması
2. Hücre içine geçişi sağlayan Dış Membran Proteinleri'nin kaybı veya ekspresyonunda azalma
3. Antibiyotiğin hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasını engelleyen aktif pompa sistemleri
4. Beta-laktamaz üretimidir.

Beta-laktamaz enzimleriyle inaktivasyon, beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde, özellikle Gram-negatif bakterilerin en sık kullandığı mekanizmadır. Beta-laktamaz genleri kromozom, plazmid, transpozon ya da integronlar da bulunabilir. Sabit bir düzeyde üretilebildikleri gibi, indüklenebilir özellikte de olabilirler (28).

4.3. Beta–Laktamaz Yapısı Ve Sınıflandırılması

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağı parçalayan, böylelikle beta laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. PBP'ler ve birçok beta-laktamaz, aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunan "serin proteazlar" ailesinin üyesidirler. Bu enzimler, beta-laktam halkasını parçalayarak bir açıl-enzim kompleksi oluştururlar. Deaçilasyon basamağının hızı, PBP ile beta-laktamazlar arasındaki temel

farklılığı oluşturur. PBP'nin yapısı su molekülü ile kolayca hidroliz olmaya izin vermez ve sonuçta beta-laktamazlara oranla PBP'ler çok daha yavaş deaçilasyona uğrar (4,24).

Beta-laktamazlar, heterojen bir grup protein olmalarının yanı sıra, bazı yapısal benzerlikler de taşırlar. Bu enzimlerin sınıflamasında genellikle iki yöntem ön plana çıkmıştır. Ambler sınıflamasında, beta-laktamazlar aminoasit dizgilerinin benzerliğine göre dört sınıfa ayrılırlar (6). A, C ve D sınıfları serin beta-laktamazlardan oluşurken; B sınıfı, aktivite için çinko iyonuna gereksinim duyan metallo beta-laktamazlardır. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması ise enzimlerin çeşitli fonksiyonel özellikleri, substrat ve inhibitör profilleri dikkate alınarak yapılmıştır ve dört ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşur (4,24) (Tablo1).

Tablo 1: Fonksiyonel ve moleküler özelliklerine göre beta-laktamazların sınıflandırılması

Fonksiyonel Grup*	Moleküler Sınıf**	Öncelikli Substrat	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Kromozomal ve plazmid kökenli AmpC tipi enzimler (CMY-3b, Smar, FOX-1-5, LAT-1-4 vb)
2a	A	Penisilinler	Gram(+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Dar spektrumlu Sefalosporinler	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler,sefamisinler hariç sefalosporinler,monobaktamlar	TEM ve SHV türevi GSBL'ler, (TEM-1-160, SHV-1-100) PER-1-2, VEB-1-3, CTX-M-1-54, GES-1-9
2br	A	Penisilinler	IRT 1-28, SHV-10 ve 26, TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	PSE-1, PSE-3-4, SAR-1
2d	D	Oksasilin, Penisilinler	OXA tipi enzimler (OXA-1-82)
2e	A	Sefalosporinler	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenabilir beta laktamazı
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, monobaktamlar	<i>E. cloacae</i> 'nin NMC-A ve IMI-1'i ve <i>S. marcescens</i> 'in Sme-1-2 enzimleri
3	B	Karbapenemler dahil birçok beta laktam (monobaktamlar hariç)	Değişik türlerce üretilen IMP-1-23, VIM-1-14
4	?	Penisilinler	<i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı

*Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre

**Ambler sınıflandırmasına göre

4.3.1. A Sınıfı Beta-Laktamazlar

A sınıfı beta-laktamazlar, aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunan, birçoğu klavulanik asit ile inhibe olan, genelde plazmid gibi hareketli genetik elemanlarca kodlanan enzimlerdir. A sınıfı beta-laktamazlar, aktif bölgelerinde 3 adet ortak motife sahiptir. Bu motifler, beta-laktamları substrat bağlayıcı cebe sabitleyecek kompleks hidrojen bağlarını oluşturur. Aktif bölgelerinde bulunan Serin₇₀-X_{aa}-X_{aa}-Lizin₃₇ (S₇₀-X_{aa}-X_{aa}-K₃₇), Serin₁₃₀-Aspartat₁₃₁-Asparagin₁₃₂ (S₁₃₀-D₁₃₁-N₁₃₂) (SDN ilmiği) ve Lizin/Arginin₂₃₄-Treonin/Serin₂₃₅-Glisin₂₃₆ (K/R₂₃₄-T/S₂₃₅-G₂₃₆) motifleri beta-laktam ajanlarının bağlanması ve hidroliz edilmesi için gerekli yapılardır (24).

Substrat bağlayıcı cepte Ser 70 ve Ala 237 amino asitlerinin NH grupları tarafından oluşturulan oksanyon deliği beta-laktamazların katalizinin gerçekleştiği bölgedir. 160-179 arası aminoasitlerden oluşan omega halkası bu sınıfa özgüdür. Bu halkada yer alan korunmuş Glu 166 aminoasidi kataliz işleminde yer alır. Arg 164 ve Asn 179 omega halkasının sınırlarını belirler. Beta-laktamaz aktivitesi sırasında Ser 70 beta-laktam halkası ile ester bağı oluşturan nukleofilik gruptur. Üç boyutlu yapıda korunmuş motiflere çok yakın olarak bulunan su molekülü ise bu ester bağına hidrolize eder ve inaktif penisilloil veya sefalosporil molekülünün ayrılmasını sağlar (24).

Enterobacteriaceae üyelerinde en sık rastlanan A sınıfı beta-laktamazlar, TEM-1 ile SHV-1'dir. Bu enzimler temel olarak penisilinazdırlar ve sefalosporinlere karşı etkinlikleri azdır. Bu enzimler, günümüzde birçok hastanede yaygın olarak rastlanan GSBL'lerin atalarıdır. GSBL'ler, birinci kuşak sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin yanı sıra, oksimino sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz edebilen, klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlardır. Sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin, sefotetan) karşı etkisizdirler (TEM-52 hariç). TEM ve SHV türevi enzimlerde GSBL fenotipi kazanma açısından beş aminoasit bölgesi önem taşımaktadır: Gly 238, Ala 237, Arg 164, Asp 179 ve Asp 104. Bu aminoasit grupları enzimin aktif bölgesinde yer alan, ona şekil veren gruplardır. Özellikle 238. pozisyondaki Gly'in Ser, Ala veya Asp ile değişimi, TEM ve SHV tipi GSBL'lerde sık rastlanan bir durumdur (24).

4.3.1.1. TEM ve SHV Türevi Grup A Enzimler

4.3.1.1.1. TEM Grubu Enzimler

Gram negatif bakterilerde en sık karşılaşılan beta-laktamazdır. *E. coli*'de görülen ampisilin direncinin yaklaşık %90'ı TEM-1 üretiminden kaynaklanmaktadır. İlk plazmid aracılı beta-laktamaz olan TEM-1, 1965'de Temoniera isimli bir hastanın kan kültüründen izole edilen *E. coli* suşunda saptanmıştır (29). TEM-1, penisilinleri ve dar spektrumlu sefolosporinleri hidrolize etmektedir. TEM-1'in ilk türevi olan TEM-2, orijinal beta-laktamazdan tek bir aminoasit değişimi (Gln39Lys) ile ayrılır (5,30). 1989'da bildirilen TEM-3, GSBL fenotipi gösteren ilk TEM tipi beta-laktamazdır. GSBL özelliğindeki TEM beta-laktamazlar Glu104Lys ya da Ser164His, Gly238Ser ve Glu240Lys aminoasit yer değişimlerine sahiptirler (5).

TEM tipi beta-laktamazlar en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae* da bulunurken *Enterobacter aerogenes*, *Morgenella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* ve *Salmonella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde de gösterilmiştir (5). TEM tipi GSBL'ler, *Enterobacteriaceae*'ye ait olmayan gram negatif bakterilerde de görülmektedir. Örneğin, bir *P. aeruginosa* suşunda TEM-42, bir *Capnocytophaga ochracea* suşunda ise TEM -17 varlığı gösterilmiştir (31,32).

4.3.1.1.2. SHV Grubu Enzimler

Enterobacteriaceae üyelerinde sık olarak bulunan bir diğer penisilinaz SHV-1 ilk kez 1972'de PIT-2 olarak Pitton tarafından tanımlanmıştır (29,33). SHV-1'in şu anki adlandırılması "sulfhydryl variable"dan gelmektedir (29). SHV-1, *K. pneumoniae* izolatlarının çoğunda kromozomal olarak kodlanırken *E. coli* de plazmid kaynaklıdır (5). SHV-1, *K. pneumoniae* türlerinde de plazmid aracılı ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur (5). SHV-1'i kodlayan genin aktarılabılır (transposable) bir elementinin bir parçası olduğuna dair hipotez olmasına rağmen kanıtlanamamıştır (5). GSBL fenotipindeki SHV varyantlarının çoğu 238. pozisyonda glisinin serin ile yer değiştirilmesi ile karakterizedir. SHV-5 ile ilişkili varyantlarının birkaçında ise 240. pozisyonda glutamat lizin ile yer değiştirmiştir. Gly238Ser ve Glu240Lys aminoasit yer değişimleri TEM tipi GSBL'lere benzer etkilere yol açmaktadır. 238. pozisyondaki serin

seftazidim hidrolizi ile; 240. pozisyonundaki lizin sefotaksim hidrolizi ile ilişkilidir (5). SHV-38, kabapenam hidroliz aktivitesi olan ilk SHV türevidir (34).

SHV tipi GSBL'ler *K. pneumoniae* suşlarından başka *E. coli*, *Citrobacter diversus* ve *P. aeruginosa* suşlarında da bulunmuştur (5).

4.3.1.1.3. İnhibitör Dirençli Beta-laktamazlar

TEM-1, TEM-2, SHV-1 ve bunların genişlemiş spektrumlu türevleri, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı iken beta-laktamaz inhibitörlerinin etkisine dirençli TEM ve SHV türevi enzimler de bulunmaktadır. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM-1 türevidir (Inhibitor Resistant TEM; IRT'ler) (24). İnhibitör dirençli TEM tipi beta-laktamazlar esas olarak klinik *E. coli* izolatlarında ve bazı *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei* ve *E. cloacae* suşlarında da bulunmuştur (5,35).

Sadece tek bir SHV türevi inhibitör dirençli enzim (SHV-10) tanımlanmıştır (24). Bu enzim, SHV-5'den farklı olarak ek bir aminoasit yer değişimi (Gly130Ser) içermektedir (5). İnhibitör dirençli enzimlerin saptanmalarının güç olması nedeniyle gerçek sıklıklarının, belirtilenden daha fazla olduğu düşünülmektedir (24).

4.3.1.2. TEM ve SHV Dışı Grup A Genişlemiş Spektrumlu Enzimler

Literatürde TEM ve SHV ailesine ait olmayan birçok A sınıfı beta-laktamaz da bildirilmiştir (29). Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER grubu (PER-1, PER-2) enzimlerdir (5).

4.3.1.2.1. CTX-M Grubu GSBL'ler

Plazmid aracılı GSBL'lerin yeni bir grubu olan CTX-M (sefotaksimazlar), 1990'lı yılların başlarında Almanya'da, daha sonra Fransa ve Arjantin'de bildirilmiştir (36). CTX-M tipi beta-laktamazlar *E. coli*, *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Proteus* spp., *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *C. freundii*, *Vibrio cholerae*, *Providencia stuartii* ve *S. sonnei* gibi *Enterobacteriaceae* türlerinde saptanmıştır (35).

Ülkemizde yapılan çalışmalar, özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinde bu enzimlerin sık olarak bulunduğunu göstermektedir (37-41). Birçok TEM ve SHV türevi GSBL'nin aksine CTX-M grubu beta-laktamazlar, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazimden daha iyi hidroliz

eder (42). Ancak, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-27 gibi yeni bazı türevler ise seftazidime karşı yüksek dirence sahiptir (20,38). CTX-M-2 grubunun üyesi olan Toho-1 enzimi klavulanat ile inhibisyona tazobaktamdan daha duyarlıdır. Fakat diğer birçok CTX-M enzimleri tazobaktam ile, klavulanik asit ile olduğundan daha kolay inhibe olurlar (42).

Sefotaksimazların 5 major grup (CTX-M-1,-2,-8,-9,-25) ve bunların alt grupları olmak üzere yaklaşık 50'den fazla tipi vardır (19,16).

Grup1 (CTX-M-1)→CTX-M-1,-3,-10,-11,-12,-15,-22,-23,-28,-29,30

Grup2 (CTX-M-2)→CTX-M-2,-4,-5,-6,-7,-20, Toho-1

Grup3 (CTX-M-8)→CTX-M-8

Grup4 (CTX-M-9)→CTX-M-9,-13,14,-16,-17,-18,-19,-21,-27, Toho-2

Grup5 (CTX-M-25)→CTX-M-25,-26

CTX-M tipi enzimler, grup içinde % 94'ten fazla; gruplar arasında ise % 90 veya daha az aminoasit benzerliği gösterirler (16,20,42). Bu enzimlerden CTX-M-3 ve CTX-M-15 ülkemizde de çeşitli *Enterobacteriaceae* üyelerinde (*E. coli*, *S. sonnei*, *K. pneumoniae*) gösterilmiştir (38,39,40,41). CTX-M-3'den tek bir aminoasit yerdeğişimi (Asp240Gly) ile farklılık gösteren CTX-M-15, ilk kez Hindistan ve Japonya da bildirilmiş ve daha sonra Kanada, Rusya, Bulgaristan, Polonya, Fransa ve Türkiye'de de gösterilmiştir (42).

CTX-M tipi enzimleri diğer GSBL'lerden ayıran önemli bir özellik, toplum kökenli izolatlarda hızla yayılıyor olmasıdır. CTX-M enzimleri, *K. pneumoniae* ve *E.coli* türlerinin neden olduğu hastane kökenli infeksiyonlarla sınırlı değildir. Bu enzimler günümüzde, hastane dışı GSBL yayılımının en önemli etkenidir (20).

Plazmid kökenli CTX-M tipi enzimlerin yayılımından IS elemanları (ISEcp1, IS903) ve integronlar gibi hareketli elemanlar sorumludur (36). ISEcp1 gibi hareketli elemanlarla olan ilişkileri bu enzimlerin toplumda bakteriler arasındaki hızlı yayılımını açıklamaktadır (20).

4.3.1.2.2. PER Grubu GSBL'ler

Özellikle ülkemizde nonfermentatif bakterilerde seftazidimi hidrolize eden bir GSBL olarak dikkati çeken PER-1 enzimi, ilk kez bir Türk hastadan izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (43). Daha sonra ülkemizde *Acinetobacter spp.* ve *S. typhimurium* gibi

izolatlarda da tespit edilmiş ve *P.aeruginosa*'da % 23.7, *Acinetobacter* spp.'de % 62'ye varan oranlarda saptanmıştır (44). Fransa, İtalya ve Belçika gibi Avrupa ülkelerinin yanı sıra Güney Kore'den de çeşitli suşlarda PER-1 varlığı bildirilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 1998-2003 yılları arasında izole edilen 289 seftazidime dirençli Gram negatif bakterinin incelendiği çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının % 46.2'sinde, *A. baumannii* suşlarının % 35.9'unda *bla_{PER-1}* gösterilmiştir (45).

PER-1 ile % 86 oranında aminoasit homolojisi gösteren PER-2; Güney Amerika'da *S. typhimurium*, *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* ve *V. cholerae* da tanımlanmıştır (46).

TEM ve SHV türeviden olmayan A sınıfı beta-laktamazların diğer önemli üyeleri; VEB-1, BES-1, IBI-1 ve IBI-2 olarak sayılabilir. VEB-1, bir integronca kodlandığı gösterilen ilk A sınıfı beta-laktamazdır. İntegron üzerinde bulunan diğer beta-laktamazlar arasında IBC-1 ve bazı PSE, OXA ve CARB türevleri sayılabilir (24).

Karbapenemler, genellikle A sınıfı beta-laktamazların etkisine dayanıklıdır. Ancak Sme-1, Sme-2, NMC-A, IMI-1 ve KPC-1 gibi bazı A sınıfı enzimler karbapenemleri de hidroliz edebilirler (24).

4.3.2. B Sınıfı Beta- Laktamazlar

Aktif bölgelerinde serin bulunan sınıf A, C ve D'den farklı olarak B sınıfı beta-laktamazlar, metallo-enzimlerdir ve aktiviteleri için çinko veya diğer metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Bunun sonucu olarak, EDTA gibi şelasyon yapıcı ajanlar aktivitelerini inhibe eder. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta-laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok beta-laktam ajana karşı dirence neden olur. Bu beta-laktamazlar, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmezler. Aztreonam bu enzimlerin hidrolizine dayanıklıdır ancak bir inhibitör gibi davranmaz (24,25).

B sınıfı metallo-beta-laktamazları kodlayan genlerin dizgileri birbirine çok benzemese de (aminoasit benzerliği; % 17-37), üç boyutlu yapıları benzerdir. Metallo-beta-laktamazların çoğu kromozomal kaynaklıdır. Sabit bir düzeyde eksprese edilebildikleri gibi, bazıları da örneğin PCM-1 (*Burkholderia cepacia*), indüklenebilir özelliktedir (24,35).

Yukarıda da belirtildiği gibi, önceleri bu grupta sadece kromozomal enzimlerin varlığı bilinirken, 1991'de Japonya'da *P. aeruginosa* ve *S. marcescens* suşlarında plazmid kökenli

bir metallo-beta-laktamaz (IMP-1) saptanmış; daha sonraları tüm dünyada ülkemizde de integron kökenli IMP ve VIM ailesi üyeleri bildirilmiştir (47-52).

Yaygınlıkları nedeniyle klinik açıdan en önemli metallo beta-laktamazlar, *P. aeruginosa*'nın IMP ve VIM tipi beta-laktamazlarıdır. İmipeneme dirençli *P. aeruginosa* suşlarının yaklaşık %20'sinin metallo- beta-laktamazlara sahip olduğu bildirilmiştir (25).

B sınıfı beta-laktamazlar 3 alt gruba ayrılır (35). B1 alt grubu içerisinde *Bacillus cereus*'un ürettiği metallo-beta-laktamaz II (BcII), *Bacteriodes fragilis*'in ürettiği CcrA, *Burkholderia cepacia*'nın PCM-1, *Chryseobacterium meningosepticum*'dan BlaB beta-laktamazı, *Chryseobacterium indologenes*'in ürettiği IND-1, bazı *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. marsescens*, *K.pneumoniae* suşlarının ürettiği IMP tipi beta-laktamazlar ve *P.aeruginosa* izolatlarının ürettiği VIM grubu beta-laktamazlar yer almaktadır. B2 alt grubunda *Aeromonas* spp. tarafından üretilen Cpha, ImiS ve CphA2 gibi beta-laktamazlar ve *Serratia fonticola*'nın ürettiği Sth-1 beta-laktamazı yer alır. B3 alt grubunda ise *Stenotrophomonas maltophilia*'nın ürettiği L1, *C. meningosepticum*'un ürettiği GOB, *Legionella gormanii*'nin ürettiği FEZ-1 ve *Janthinobacterium lividum*'nun ürettiği THIN-B beta laktamazları bulunmaktadır (47,53,54).

4.3.3. C Sınıfı Beta- Laktamazlar

Ambler C sınıfı beta-laktamazlar (Bush-Jacoby-Medeiros Grup1 beta-laktamazlar) da serin bata-laktamazlar olup kromozomal ya da plazmid kökenli olabilirler. Bu beta-laktamazlar esas olarak sefalosporinazlardır (35).

4.3.3.1. Kromozomal AmpC Tipi Beta-laktamazlar

Kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanan, bu nedenle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* hariç tüm Gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır (24). Özellikle *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *M. morgani*, *P. aeruginosa* ve *S. marsescens* kromozomal AmpC tipi beta-laktamazlar içerir (35,25).

AmpC tipi beta-laktamazları yüksek miktarda üreten bakteriler penisilinlere, beta-laktamaz inhibitörlerine, sefoksitine, seftazidime, seftriaksona ve sefotaksime dirençlidir (25). Bu enzimler yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sulfonların beta-laktam halkalarına bağlanamazlar ve bu nedenle de beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler (3).

Karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, bu enzimlerin aşırı üretimi, dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir (35,55).

Grup 1 enzimlerin çoğu indüklenebilir niteliktedir. Yani ortamda bir beta-laktam ajan varsa salınırlar. Beta-laktamaz indüksiyonu için bakteri hücresinde *ampC*, *ampD*, *ampG* ve *ampR* olmak üzere dört işlevsel gen bulunmalıdır (3,56). *E.coli*'de *ampR* bulunmadığı için bu türde indüklenebilir kromozomal enzimler görülmez (35).

Normal şartlarda, klinik olarak önem taşıyan Gram negatif suşlardaki C sınıfı beta-laktamaz üretimi kontrol altındadır. Bu üretimin baskılanması ve ekspresyonu, hücre duvar sentezi ve yıkımı ile ilişkilidir. Bu mekanizmalar en çok *Enterobacter spp.* türlerinde çalışılmıştır. *ampC*'nin ekspresyonunda, transkripsiyonel bir düzenleyici olan AmpR, hem baskılayıcı hem de aktive edici bir rol üstlenir. AmpR, normal durumda hücre duvar sentezinde yer alan UDP MurNac-pentapeptid ile etkileşim halindeyken baskılayıcı işlev görür, *ampC*'yi aktive edemez. Hücre duvar yıkım ürünü olan anhidro-Mur NAc-tripeptid yüksek konsantrasyonlara ulaştığında AmpR ile UDP MurNac-pentapeptid birbirinden ayrılır ve AmpR bir aktivatör olarak görev yapar. AmpC ekspresyonu başlar. Bazı beta-laktam ajanlar, etkileri sonucu önemli miktarda anhidro-MurNac-tripeptid salınımına neden olarak *ampC* ekspresyonun artmasını sağlar. Bu tür bir indüksiyon durumunda, sadece antibiyotik ortamda olduğu sürece yüksek düzeyde beta-laktamaz üretimi söz konusudur (24).

Sürekli yüksek düzey AmpC beta-laktamaz üretimi, çoğunlukla *ampD* genindeki mutasyon sonucu gelişir. Bu mutasyonun sonucu olarak, hücre içinde sürekli yüksek düzeyde anhidro-MurNac-tripeptid bulunmakta ve bu durum da, AmpR'nin *ampC* transkripsiyonunu aktive etmesine neden olmaktadır. Sürekli AmpC üretimi, *ampR* geninin delesyonu sonucu da görülebilir. Ancak bu durumda üretim genellikle düşük düzeyde kalmaktadır (24,57).

4.3.3.1. Plazmid Kökenli AmpC Tipi Beta-laktamazlar

Plazmid kökenli aktarılabılır AmpC tipi beta-laktamazlar, kromozomal AmpC beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile gelişmiştir (58).

Plazmid kaynaklı C sınıfı enzimler, birçok Gram negatif türde ve dünyanın birçok yerinde bildirilmiştir. Bu tür enzimler daha çok *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Salmonella spp.*, *P. mirabilis*, *M. morgani* ve *K. oxytoca* gibi suşlarda saptanmıştır (18,35,59).

Özellikle AmpC tipi enzim aşırı üretimi dış membran porin kaybı veya bir diğer beta-laktamazın sentezi gibi ek bir mekanizma ile birleştirildiğinde enzimlerin etki spektrumları iyice genişlemektedir. Örneğin, plazmid kökenli ACT-1 beta-laktamazını üreten *K. pneumoniae* suşlarında 42 kDa'lık bir dış membran proteinin kaybı, imipenem direncine yol açmaktadır (55).

Aminoasit benzerliklerine ve kökenlerine göre plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar beş gruba ayrılmaktadır (35,59).

1. C-1 grubu: *C. freundii*'nin kromozomal AmpC enziminden köken alan çoğu CMY ve LAT grubu enzimler
2. C-2 grubu: *Aeromonas* türlerinin kromozomal AmpC enziminden köken alan CMY-1, CMY-8, CMY-9, CMY-11, MOX-1, MOX-2, FOX enzimleri
3. C-3 grubu: *E. cloacae*'nin kromozomal enziminden köken almış ACT-1 ve MIR-1 enzimleri
4. C-4 grubu: *M. morgani*'den köken alan DHA-1 ve DHA-2 enzimleri
5. C-5 grubu: *Hafnia alvei*'nin kromozomal AmpC enziminden köken almış ACC-1 enzimi (11,42).

4.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar

D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup, oksasilini hızla hidroliz edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidroliz edebilen beta-laktamazlar (OXA), daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P.aeruginosa*'da saptanmıştır. OXA enzimleri penisilin, kloksasilin, oksasilin ve metisilin direncine neden olur (5,24). Bu beta-laktamazlar klavulanik asitle çok az inhibe olmalarına rağmen, NaCl ile güçlü bir şekilde inhibe olmaktadır (25).

A ve D grubu beta-laktamazların primer ve sekonder aminoasit dizilimleri farklı olsa da, üç boyutlu yapıları benzerdir (60). Her iki grup da serin beta-laktamazlardır (24).

D grubu enzimler arasında klinik olarak önem taşıyan iki grup, OXA tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve OXA tipi karbapenemazlardır. Her iki grup da serin beta-laktamazlardır (61). OXA-2, OXA-10-11, OXA-14, OXA-16-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35 GSBL karakterindedir (19). Bunların büyük kısmı ilk kez ülkemiz kaynaklı suşlarda bildirilmiştir (62,63)

Daha çok *A. baumannii* suşlarında karbapenemaz niteliğindeki OXA beta-laktamazlarına sık rastlanılmaktadır (61). OXA-23-27, OXA-40, OXA-48-51, OXA-55, OXA-58, OXA-64-66, OXA-68-71, OXA-75-78 karbenemleri hidrolize eden türevlerdir (64,65,66). Türkiye’den bildirilen OXA-69 beta-laktamazı hastanemiz suşlarında gösterilmiştir (64).

Aminoasit dizilerinin benzerliğine göre 3 alt gruba ayrılan bu enzimlerin; aralarında Türkiye’nin de bulunduğu çeşitli Avrupa ülkelerinden, Singapur, Çin gibi uzakdoğu ülkelerinden, Arjantin ve Güney Afrika gibi birbirinden çok farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş suşlarda saptanmaları, önemlerini arttırmaktadır (60,64).

4.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayılım Yolları

Antibiyotikleri inaktive eden veya hedefi değiştiren enzimlerle ilgili genler, konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon gibi mekanizmalar aracılığıyla bir mikroorganizmadan diğerine geçebilirler (4). Gen transferinde, verici hücre toplam DNA’sının bir bölümünü veya tamamını alıcı hücreye aktararak alıcı hücrenin rekombinant hücre haline dönüşmesine neden olur (67).

4.4.1. Transformasyon

Bazı bakteri türleri, ortamda bulunan verici hücre tarafından bırakılmış lineer, tek iplikli, çıplak DNA parçalarını uygun koşullar altında, hücre içine alabilme yeteneğine sahiptir. Bu genler homolog rekombinasyonla kromozoma entegre olur (68). Burada önemli olan alıcı hücrenin özelliğidir. Alıcı hücre, çevresinde bulunan DNA parçalarını içine alabilmek için hücre duvarında bazı değişiklikler meydana getirmek zorundadır. Hücre bölünmesinin belli bir döneminde yapılan bazı proteinler (kompetans faktörü) aracılığıyla hücre geçirgenliği değiştirilmekte; hücre bu işlem sonucu, belli büyüklükte olması koşuluyla, DNA parçalarını içine alabilme özelliğine kavuşmaktadır. Hücre içine alınan DNA parçası rekombinasyon yoluyla hücre kromozomuna katılmakta, yeni genetik özellikler bu yolla kazanılmaktadır (67). Örneğin *Streptococcus pneumoniae*, mozaik PBP genlerini bu yolla kazanır (4).

4.4.2. Transdüksiyon

Genetik bilginin bir bakteriden diğerine bakteriyofaj aracılığı ile taşınmasına transdüksiyon denir. Viruslar aracılığı ile konak hücre genlerinin transferi iki şekilde meydana gelir (69).

4.4.2.1. Genel (Kısıtlanmamış) Transdüksiyon

Bu tip transdüksiyonda, fajların enfekte ettikleri konak kromozomu üzerindeki genlerin yaklaşık olarak eşit şansa alıcı bakterilere taşınabilmesi söz konusudur.

Faj bakteri hücre duvarına tutunarak DNA'sını hücre içine bırakır. Bakteriyel DNA faj enzimlerince parçalanırken, faj DNA'sı kopyalanır, faj kılıf proteinleri de hücresel enzimler aracılığıyla sentezlenir. Faj DNA'sı ve kılıf proteinleri bir araya getirilerek yeni fajlar oluşturulurken bakteriye ait DNA parçacıklarından bazıları faj DNA'sı içinde yer alır. Hücrenin parçalanması ile ortama salınan fajlar diğer hücreleri enfekte eder (67).

4.4.2.2. Özelleşmiş (Kısıtlı) Transdüksiyon

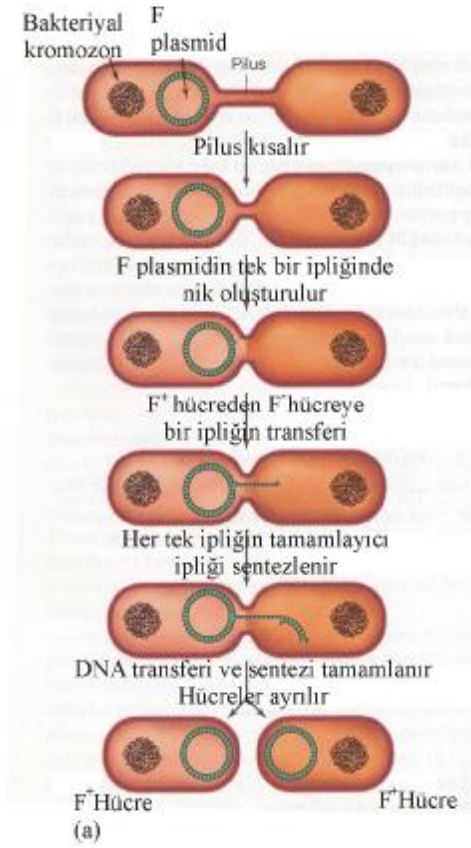
Bakteriyofaj girdiği bakteri hücresinin kromozomunun hep aynı noktasına yapışıp bütünleştiği için ayrılırken her zaman aynı DNA parçasını yeni girdiği bakteriye aktarır. Özelleşmiş transdüksiyon yapabilen fajların en önemlisi, *E. coli*'nin λ fajıdır. Bu durumda transdüksiyon, *gal* (galaktoz) veya *bio* (biotin) genleri ile sınırlanmıştır. Transdüksiyonun bu genlerle sınırlı kalmasının nedeni; λ fajının her zaman *E. coli* kromozomunda bu iki gen arasındaki *att* "attachment" denilen yerden girmesidir (68,69).

4.4.3. Konjugasyon

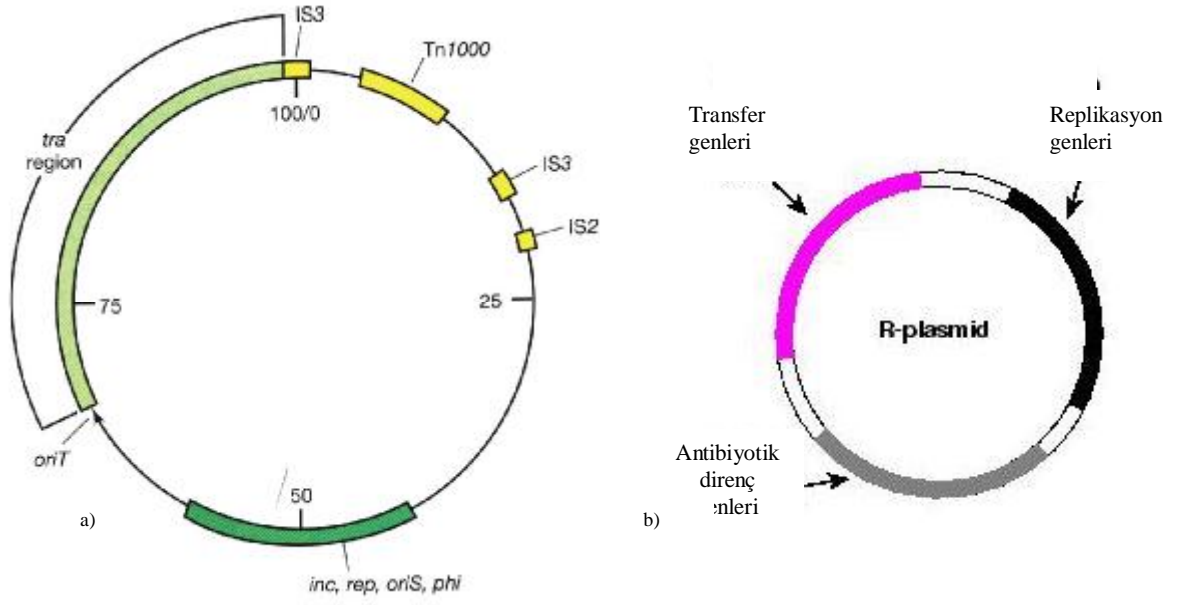
Konjugasyon, hücre hücre teması ile genetik bilginin bir bakteriden diğerine transferidir (69). Konjugasyon konjugatif plazmidler, konjugatif transpozonlar gibi çeşitli genetik elemanlar aracılığıyla gerçekleşmektedir (70). Konjugatif plazmidlerin prototipi F plazmididir. Verici hücre F^+ hücre olarak, alıcı hücre ise F^- hücre olarak adlandırılmaktadır (68). F plazmid üzerindeki genetik bilgi seks pilusu sentezleme yeteneği gibi bakteri hücresinin verici hücre olması için gerekli faktörleri sağlamaktadır. Pilus, konjugasyon sırasında iki hücre arasında temas kurar (Şekil 2) (71). Konjugatif plazmidlerin bir tipi olan R (direnc) plazmidleri antibiyotik direnc genlerini ve plazmidin transferi için gerekli genleri taşımaktadır (Şekil 3b) (71).

Konjugasyonu kontrol eden genler plazmidin *tra* bölgesinde yer alır (Şekil 3a ve b) (68). Relaksozom adı verilen bir nükleoprotein kompleksi plazmidin özel baz dizisine sahip transfer orijininin (*oriT*) tek zincirinde bir kırık/çentik oluşturur (72). Çentik, dönen halka "rolling circle" replikasyonunu başlatır ve dönen halkanın lineer kolu pilus içinde karşı tarafa doğru hareket eder. Diğer iplik verici hücrede kalır. Bu iki iplik DNA replikasyonu için kalıp

görevi görür. Transfer devam ederken verici ve alıcı hücrede tamamlayıcı DNA iplikleri sentezlenir (Şekil 2) (68).

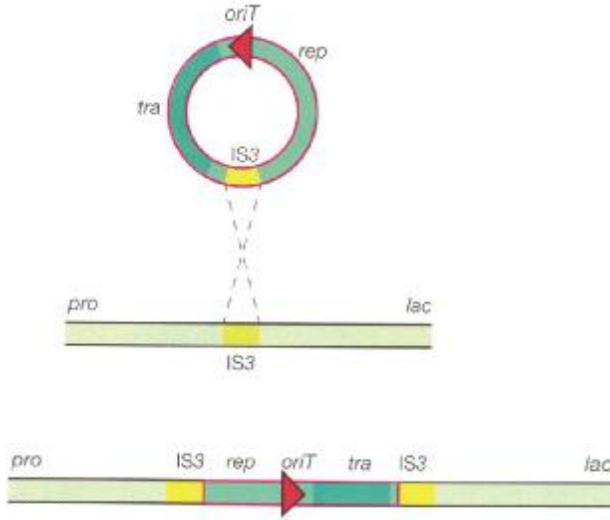


Şekil 2. Konjugasyon işlemi ile plazmid DNA'nın transferi (68)



Şekil 3. a) *E. coli* F plazmidinin genetik haritası. Sayılar plazmid uzunluğunu göstermektedir. tra, transfer işlemleri; ori T, transfer orijini; inc, incompatibilite grup; rep, replikasyon işlemleri; ori S, replikasyon orijini. Sarı ile gösterilen bölgeler bakteriyel kromozoma entegre olarak, farklı Hfr suşlarının oluşmasına neden olan yer değiştirebilen genetik elementler, b) Tipik bir R plazmidini (68)

F plazmidini serbest ya da kromozoma entegre olabilir. Kromozoma entegre olmuş F plazmidine sahip olan ve etkin bir genetik rekombinasyon gösteren bakteriyel suşlar Hfr (High frequency of recombination=Yüksek sıklıkta rekombinasyon yapabilen) olarak adlandırılır. Plazmid, kromozomun parçası olduğu için Hfr suşlarında konjugasyon, konak hücre kromozomunun transferine yol açmaktadır (Şekil 4) (68,71).



Şekil 4. F plazmidinin kromozoma girişi IS elementlerinin bulunduğu çeşitli spesifik bölgelerde olur. Şekildeki F plazmidinin giriş yeri olan IS3, kromozomal genler *pro* ve *lac* arasındadır. Ok, transfer orijinini (*oriT*) göstermektedir (68)

4.4.4. Hareketli Elemanlar

Beta-laktamaz genleri yukarıda sözü edilen mekanizmaları kullanarak bir mikroorganizmadan diğerine geçebilirler. Beta-laktamaz genleri, bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanların üzerinde de yer alabilir. Hareketli elemanlar, dirençli genlerin yayılımlarını kolaylaştırmakta ve önemli tedavi sorunlarına yol açmaktadır (4,20).

4.4.4.1. Plazmidler

Plazmidler, kendi kendini eşleyebilen, kromozom dışı genetik elemanlardır. Birçok plazmid sirküler yapıdadır. Büyüklük olarak 1500-400.000 baz çifti arasında değişir. Büyük plazmidler (20-120 kb) direnç ile ilgili genetik bilgiyi kodlayabilir. Plazmid üzerinde çoğunlukla antibiyotik direnç genleri, virulans genleri ve plazmidin kendi replikasyonu ve aktarımı için gerekli proteinler kodlanır (Şekil 3) (73). Plazmidler, genellikle içinde bulunduğu bakteriye kazandırmış oldukları özellikler göz önüne alınarak adlandırılırlar (F plazmidi, R plazmidi vs) (Şekil 3).

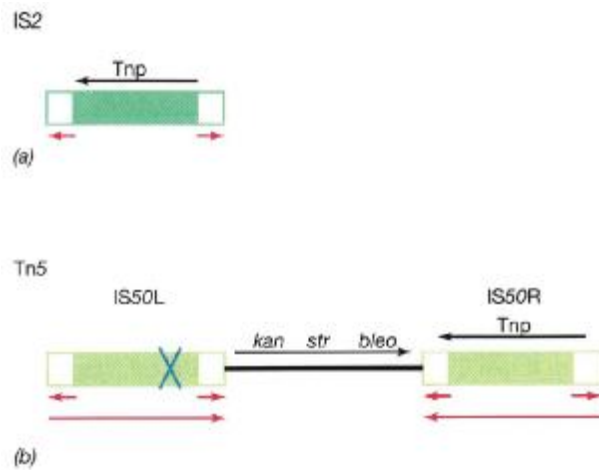
4.4.4.2. Transpozonlar ve Katılım Dizileri (IS=Insertion Sequences)

Bakterilerin genomunda Transpozon ve IS olarak adlandırılan yer değiştiren hareketli genetik elemanlar bulunmaktadır (68). Plazmidlerden farklı olarak kendi replikasyonları için genetik bilgiye sahip olmadıklarından bağımsız çoğalamazlar.

IS elemanlarından daha büyük olan transpozonlar, genellikle yapılarında transpozisyon işlemini için gerekli olan genlerin yanı sıra çeşitli antibiyotik direnç genlerini de taşırlar (Şekil 5) (24). Plazmid kökenli beta-laktamazlar, tetrasiklin direnç genleri ve aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler gibi birçok direnç geni aslında transpozonlar içinde bulunmaktadır. Transpozonlar, geniş konak özgülükleri nedeni ile direnç genlerinin değişik türler arasında aktarımında da önemlidir (4).

Transpozonlar üç sınıfta incelenebilmektedir:

- Kompozit transpozonların her iki ucunda bir IS elemanı bulunmakta ve terminal tekrarlar ya direkt tekrar ya da tersine tekrar şeklinde yerleşmişlerdir.
- Tn3 benzeri transpozonların her iki ucunda 35-58 baz çiftinden oluşan ve tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. Bunlarda IS elemanı yoktur.
- Bazı transpozonlarda ise herhangi bir IS elemanı veya tekrarlanan DNA dizileri bulunmaz (68).



Şekil 5. Transpozisyon yapabilen elemanlardan IS2 ve Tn5. Kırmızı oklar tersine tekrarlanan dizileri göstermektedir. (Tnp, transpozaz enzimini kodlayan DNA dizisi) (68)

Tn5, solunda ve sağında IS50L ve IS50R elementlerini içeren kompozit bir transpozondur. IS50L, mavi çarpı konulan yerde anlamsız mustasyona sahip olduğundan bağımsız olarak transpozisyon yapamaz. Tn5, Antibiyotik direnç genleri (*kan, str, bleo*) taşır (68).

IS elemanlarının iki ucunda tekrarlanan (IR; inverted repeat) ve birbirinin komplementeri olan kısa DNA dizileri ile, ortasında da kendisinin yer değiştirmesini (transpozisyonu) sağlayan diziler bulunur. Yer değiştirmede etkili olan faktör ortada bulunan ve transpozaz olarak adlandırılan enzimin sentezini kodlayan DNA dizileridir (şekil 5). IS elemanları oldukça kısadır. Uzunluğu 2000 baz çiftini geçmez (68,69).

Transpozonlar ve IS elemanları, genom üzerinde farklı noktalara girebilir ve girme noktalarında gen ekspresyonunu değiştirebilir. Bir gene bağlanarak geçici bir süre genin inaktif olmasına neden olabilir ya da buldukları bölgedeki veya civarındaki genleri aktive edebilirler (68).

4.4.4.3. İntegronlar

Direnç genleri ile ilgili bir diğer genetik eleman da integrondur (4). Integronlar, integraz kodlayan bir gen ile gen kasetlerini içeren yapılardır. Integraz enzimi sayesinde gen kasetleri hedef diziye entegre olur (74,75). Direnç integronları (RI) ve süper integronlar (SI) olmak üzere iki grup integron vardır. Direnç integronları genellikle transpozonlar, plazmidler ve bakteriyel kromozomda bulunmaktadır. Direnç integronlarındaki gen kasetleri antibiyotiklere ya da dezenfektanlara karşı direnç kazandırır. Süper integronlar bakteriyel kromozoma yerleşmiştir. Süper integronlardaki gen kaset sayısı dirençli integronlardaki gen kaset sayısından daha fazladır (75).

İntegronlar çok yaygın genetik elemanlar olup kendi başlarına hareketli değildir. Ancak gen kasetlerini ve özellikle de antibiotik direnç genini içeren gen kasetlerini yapılarına entegre edebilmeleri nedeniyle antimikrobial direnç yayılımında önemli rol oynamaktadır (74).

4.5. Beta-laktamazların Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Beta-laktam antibiyotikler, gerek toplum gerekse hastane kaynaklı infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir. Özellikle Gram-negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklerde önde gelen direnç mekanizması, beta-laktamaz üretimidir. Klinikte sık kullanılan geniş spektrumlu beta-laktamlara dirence yol aması nedeniyle GSBL'ler, en önemli beta-laktamaz gruplarından biridir. Bu sebepten dolayı beta-

laktamazların belirlenmesi ve tanımlanması çok önemlidir. Bu enzimlerin kesin tanımlanması yalnızca dizi analizi ile mümkündür. Ancak klinik laboratuvarlarda tarama amacıyla öncelikle basit beta-laktamaz saptama ve tiplendirme testleri yapılmaktadır (76).

4.5.1. Fenotipik Tarama Ve Doğrulama Testleri

Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL varlığını göstermek ve doğrulamak için çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır (77).

CLSI önerilerine göre, *K. pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E. coli* için disk difüzyon yöntemiyle sefotaksim (30µg), seftriakson (30µg), seftazidim (30µg), aztreonam (30µg) veya sefpodoksime (10µg) karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır (Tablo 2) (78). Tarama için birden fazla antimikrobik ilaç kullanılması testin duyarlılığını artırır (78).

Tablo 2. GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zon değerleri (78)

Antibiyotik İnhibisyon zonu (mm)		
	<i>K. pneumoniae, K.oxytoca</i> ve <i>E. coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Sefotaksim	≤ 27	≤ 27
Seftriakson	≤ 25	–
Seftazidim	≤ 22	≤ 22
Sefpodoksime	≤ 17	≤ 22
Aztreonam	≤27	–

GSBL için kullanılan fenotipik doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler, GSBL'leri beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen AmpC tipi enzimlerden ayırt etmektedir.

Doğrulama amacıyla değişik yöntemler tanımlanmıştır. Bunlardan en sık kullanılanları; klavulanik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı, çift disk sinerji yöntemi ve E-test yöntemidir (79,80).

4.5.1.1. Klavulanik Asit İçeren Kombinasyon Disklerinin Kullanımı

Bu amaçla klavulanik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve seftotaksim diskleri kullanılır. Agar disk difüzyon yöntemi uygulandıktan sonra klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla 5 mm veya daha fazla ise, izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilmektedir (78).

4.5.1.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi

Bu yöntemde test edilecek mikroorganizma Mueller-Hinton agar besiyerine homojen olarak yayılmaktadır (66). Amoksisilin klavulanat (20 + 10 µg) içeren disk plağın merkezine, seftazidim (30 µg) diski amoksisilin klavulanat diskinden 25-30 mm uzağa yerleştirilmektedir. Farklı bir oksimino-sefalosporin içeren disk (tercihen seftotaksim (30 µg)) ise zıt tarafa yerleştirilir. Plak 37°C'de bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra sefalosporin etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin klavulanat diskine doğru genişlemesi veya arada bakteri üremediği bir sinerji alanının bulunması, GSBL varlığını göstermektedir (76). Testin duyarlılığı disklerin arasındaki uzaklığın 20 mm ye indirgenmesiyle artırılabilir (80).

4.5.1.3. E test Yöntemi

Bir tarafında seftazidim gradienti diğer tarafında seftazidim-klavulanat gradienti içeren E testleri GSBL saptamak için kullanılabilir. Seftazidim MİK değerinin seftazidim klavulanat MİK değerine oranı ≥ 8 ise GSBL varlığını göstermektedir (76,79).

4.5.1.4. Fenotipik GSBL Testlerinin Sorunları

İndüklenebilir AmpC beta-laktamaz taşıyan türler: İndüklenebilir AmpC kromozomal enzimlere sahip *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL'leri saptamak daha zordur. AmpC beta-laktamazlar klavulanik asitle inhibe edilemez ve CLSI doğrulama testleri ile GSBL tanımlanmasını maskeleyebilir (79).

AmpC yapan izolatlarda GSBL saptanması için seftapimin kullanıldığı modifiye çift disk sinerji testi uygulanmaktadır (81).

K. oytoca: *K. oytoca* izolatlarının % 10-20'si yine sınıf A bir beta-laktamaz olan K1 kromozomal beta-laktamazını fazla üretirler. Bunlar seftodoksime ve sıklıkla seftotaksime

dirençli fakat seftazidime dirençli değildir. Bu izolatlarda, sefotaksimli yada sefepimli klavulanat sinerji testleri pozitif sonuç verebilir. Bunun sonucunda K1 kromozomal beta-laktamaz üreten izolatlar GSBL üretenlerle karıştırılabilir (79).

Acinetobacter, *P. aeruginosa* ve *S. maltophilia* gibi nonfermentatif türler için yukarıda belirtilen yöntemler kullanılamaz (79).

4.5.1.5. İzoelektrik Odaklama

İzoelektrik odaklama yöntemi genel olarak proteinlerin izoelektrik noktasını belirlemek için kullanılmaktadır (82). Bu amaçla organik asit ve baz karışımı ile bir pH gradienti hazırlanır ve jele yayılır. Bu jele bir protein çözeltisi ilave edilince; protein, pI (izoelektrik nokta) değerine eşit pH'a gelinceye kadar göç eder. Böylece farklı pI olan proteinler birbirinden ayrılabilir (82).

Birçok beta-laktamaz benzer izoelektrik noktalarına sahiptir ve bu yüzden günümüzde izoelektrik odaklama yöntemi ile ayırım güçleşmiştir (15).

Çift disk sinerji testiyle GSBL paterni görülmesi ve izoelektrik odaklama gibi fenotipik yöntemler tek başlarına beta-laktamaz genlerinin saptanmasında yeterli değildir. Fenotipik yöntemler yanlış pozitif sonuca neden olabilir (83).

4.5.2. Moleküler Yöntemler

Beta-laktamaz genlerinin belirlenmesinde moleküler biyolojik yöntemler önerilmektedir. Bu amaçla, oligotiplendirme, PZR, PZR-REA, PZR-SSCP ve klonlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (15).

Dizi analizi, bakterilerdeki spesifik beta-laktamaz genlerinin belirlenmesi için altın standarttır. Bir bakteri farklı GSBL'ler üretebilmektedir. Bu gibi durumlarda multipleks PZR-dizi analizi işlemlerine gerek duyulmaktadır. PZR-REA, oligotiplendirme gibi yöntemler genellikle GSBL'lerin yalnızca bir tipini belirlemektedir (15).

4.5.2.1 Oligotiplendirme

Beta-laktamazların tanımlanmasında ilk moleküler yöntem oligotiplendirme yöntemidir. Bu yöntem, oligonükleotid proplar ile nokta mutasyonlarını saptanmasına dayanır (84).

4.5.2.2 PZR

PZR nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir sistemdir. Hedef DNA/ RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan vermektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu bir çeşit in vitro klonlamadır. Fakat DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilmektedir (85). PZR yöntemi bazı GSBL'ler örneğin PER için tek başına kullanabilmektedir. Ancak beta-laktamaz tiplendirilmesinde PZR genellikle başka yöntemlerle beraber uygulanmalıdır.

4.5.2.3 PZR-SSCP

Single strand conformation polymorphism (SSCP) yöntemi, yüksek ayrımlı denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutasyon içeren ve doğal tip tek sarmallı DNA'nın farklı hareketlilik göstermesi temeline dayanmaktadır (86,87). Bu yöntem *bla_{SHV}* genindeki spesifik lokasyonlarda tek baz mutasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Yöntemde oligonükleotid primerler kullanılarak 475 bp amplimerler oluşturulmakta ve *PstI* restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. SHV-1,-2,-3,-4 ve -7 beta-laktamaz genleri kesilen amplimerlerin farklı elektroforetik hareketliliği ile tanımlanabilir (5).

4.5.2.4 PZR-REA (Restriksiyon Enzim Analizi= Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))

PZR-REA, PZR sonrası elde edilen DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilmesine dayanır (80,88).

Bu yöntemin avantajı çok az DNA ile çalışılması, kısa sürede sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Yöntemin dezavantajları ise genomda ortaya çıkan doğal mutasyonların kesim bölgelerini değiştirebilmesi ve bazen kısmi kesimlerin olmasıdır (88).

4.5.2.5 Klonlama ve Dizi Analizi

GSBL yayılımının engellenmesindeki ilk basamak toplum veya hastane kökenli izolatlarda hangi tip GSBL'nin hakim olduğu, yayılma hızı ve yollarının anlaşılmasıdır. Bunun için de öncelikle izolatların içerdiği GSBL tipleri doğru olarak tanımlanmalıdır. Son yıllarda PZR ve dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin bu soruna büyük ölçüde çözüm getirmesine rağmen, tek basamaklı PZR ve ardından dizi analizi uygulaması aynı aileden birden fazla GSBL

üretildiğinde yanlış veya yetersiz sonuç vermektedir. Bu nedenle de öncelikle bakterilerin ürettiği GSBL'lerin ayrılması gerekmektedir. Aynı organizmada SHV veya TEM tipi beta-laktamazların farklı varyantları bir arada bulunabilmektedir. *E. coli*'deki TEM-1 veya *K. pneumoniae*'daki SHV-1 gibi hem geniş spektrumlu beta-laktamaz ile hem de genişlemiş spektrumlu bir başka beta-laktamazın da bir arada olduğu durumlar olabilmektedir. Bu durumda, GSBL'yi saptayabilmek için klonlama, ardından dizi analizi yapmak gerekmektedir. Ancak dizi analizi zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Günümüz şartlarında ancak rutin dışı uygulamalarda beta laktamaz genleri klonlanmakta, ardından dizi analizi uygulanmaktadır.

4.6. GEN KLONLAMA

Gen Klonlama Teknolojisi "Rekombinant DNA Teknolojisi" olarak da adlandırılmakta olup genetik bilginin (DNA) bir organizmadan aynı ya da farklı türe ait diğer bir organizmaya aktarımını kapsar. Klonlama, istediğimiz bir genin konak hücre tarafından çoğaltılması olayıdır (69,85).

Gen klonlamanın genel olarak aşamaları aşağıdaki gibidir:

• Hücrelerden DNA izole edilir. İstenilen gen PZR ile çoğaltılır.

• PZR ürünleri, vektör ya da taşıyıcı molekül adı verilen diğer DNA molekülleri ile birleştirilir. İçine yeni bir DNA parçası sokulmuş olan vektör, bir rekombinant DNA molekülüdür.

• Kendi DNA'sı ile birlikte, üzerinde yabancı DNA molekülünü taşıyan vektörün oluşturduğu rekombinant DNA molekülü, bir konak hücreye aktarılır. Rekombinant molekül konak hücre içerisinde kendini eşler.

• Konak hücre kendisini eşlerken, rekombinant DNA molekülleri de yavru hücrelere geçer ve her biri klonlanmış DNA dizisinin kopyalarını taşıyan konak hücre topluluğu oluşur (69).

4.6.1. Vektörler

DNA parçaları klonlama için bakteri hücrelerine doğrudan giremezler. Ancak bir DNA parçası bir vektör ile birleştirilirse, konağa girebilir ve orada kendini eşler. Gerçekte vektörler taşıyıcı DNA molekülleri ve DNA parçalarının alıcı hücreye aktarılmasını sağlarlar. Bir DNA molekülünün vektör olarak görev yapabilmesi için bazı özellikleri taşıması gerekmektedir (69).

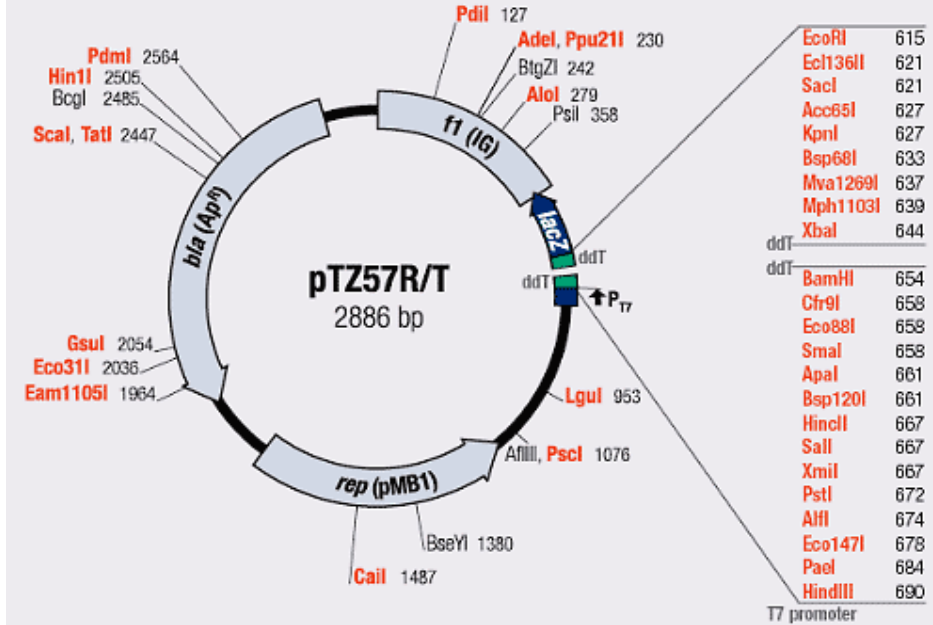
1. Alıcı hücrenin kromozomundan bağımsız olarak kendisini ve taşıdığı DNA molekülünü çoğaltabilmelidir. Replikasyon orijini olmalıdır.
2. Ona diğer hücreler arasından seçilebilmesini sağlayacak özelliği kazandıran bir gen (belirleyici bir marker) taşınmalıdır. Bu, bir antibiyotik direnç geni veya konak hücrede olmayan bir enzime ait gen olabilir.
3. Konaktan kolay izole edilebilir olmalıdır.
4. Vektör üzerindeki restriksiyon enzimlerinin sadece bir kırılma bölgesi olmalıdır yani tek ve özel bir restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurmalıdır.

Çeşitli büyüklükteki DNA parçalarını klonlamasını sağlayan çok sayıda vektör (plazmid vektörler, bakteriyofaj vektörler, kosmid vektörler vs.) kullanılmaktadır.

4.6.1.1. Plazmid Vektörler

İlk geliştirilen vektörler genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmidlerdir. Plazmidler, yaygın olarak kullanılan, ancak nisbeten küçük DNA parçalarının klonlanmasına olanak sağlayan vektörlerdir. Plazmidler, bakteride bulunan ekstra kromozomal, çift iplikli ve halkasal yapıdaki DNA molekülleridir ve bakteri içinde bağımsız olarak eşlenebilirler. Bir konak hücreye sadece bir plazmid girmesine rağmen, plazmid kendisinin çok sayıda kopyasını oluşturacak şekilde çoğalır. Bu tür bir plazmid, vektör olarak kullanıldığında, klonlanmış DNA'nın çok sayıda kopyasının oluşmasını sağlar. Vektör olarak kullanılan plazmidler, bazı restriksiyon enzimleri için sınırlı sayıda uygun enzim kesim bölgesini ve plazmidi taşıyan konak hücreleri ayırt etmeye yarayan belirleyici genleri taşıyacak şekilde değişikliğe uğratılırlar (69).

Genetik mühendisliği ile oluşturulmuş birçok plazmid vektör vardır ve bu vektörler kendilerini içeren konakların belirlenmesini kolaylaştıran bazı özelliklere sahiptirler (Şekil 6)(69,89). Örneğin bu çalışmada gösterilen ve Şekil 6'da gösterilen pTZ57R/T plazmid vektör sistemi, bakterilerde ampisilin ve mavi/beyaz koloni seçiciliğine göre ayırım yapmaktadır. Plazmid üzerinde bulunan ampisilin direnç geni duyarlı kompetan hücrede (örneğin JM107) bulunmadığından ampisilinli besiyerinde sadece bu plazmidi taşıyan bakteriler üreyebilmektedir (69,89).



Şekil 6. pTZ57R/T plazmidi (89)

Benzer şekilde farklı plazmid vektör sistemlerinde başka direnç genleri de (kanamisin) kullanılabilir (90). Mavi/ beyaz seçiciliğinde beyaz koloniler genellikle hedef DNA içeren plazmidleri gösterirken, mavi koloniler DNA ile birleşmeden ligasyona uğramış plazmidleri gösterirler. Mavi/ beyaz koloni taramasında *lac*⁺ genotipini belirlemek için X-Gal ve IPTG birlikte kullanılmaktadır. IPTG (izopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozid) *lacZ* represörünü inaktive eder, beta-galaktozidaz sentezini uyarır. X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indol beta-D-galaktozid), mavi renk oluşturan beta-galaktozidaz enziminin kromojenik substratıdır.

Plazmid üzerinde *lacZ* geni bulunmaktadır. Hedef DNA, plazmid içine yerleştiğinde bu gen inaktive olmakta, X-gal ve IPTG eklenerek hazırlanmış besiyerinde hedef DNA içeren plazmidler beyaz koloniler oluştururken, ligasyon basamağında hedef DNA'nın eklenemediği plazmidleri içeren bakteriler mavi koloniler oluşturmaktadır (91).

4.6.2. Klonlama Yöntemleri

PZR ürünlerinin klonlanmasında en az üç yöntem vardır:

• T/A klonlama

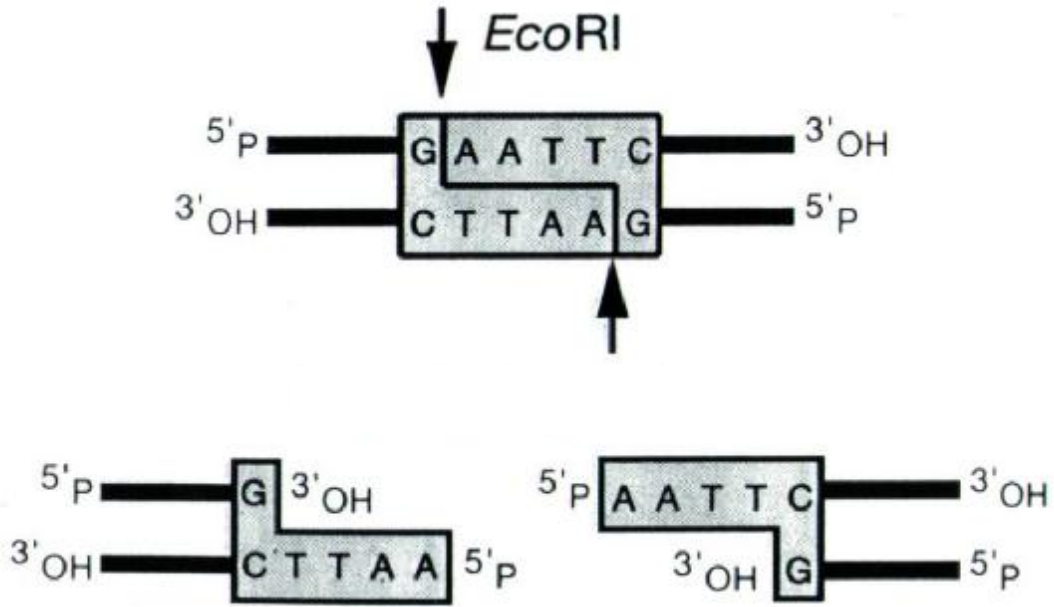
• Yapışkan uç oluşturan restriksiyon enzimlerini kullanarak yapılan klonlama

• Küt uç oluşturan restriksiyon enzimlerini kullanarak yapılan klonlama

Bu işlemlerde kullanılan restriksiyon endonükleazları bakterilerden izole edilmektedir. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virus infeksiyonunu önlediği ya da kısıtladığı için bu ismi almışlardır. Restriksiyon enzimleri özgül ve "palindromik" DNA dizilerini tanırlar ve her iki DNA zincirini bu dizilerden keserler (69,85). Zaten bu enzimlerin klonlama için önemli olmalarının nedeni, DNA'yı her zaman özgül bölgelerden kesebilmeleridir (85). Bazı restriksiyon enzimleri çift iplikli DNA'yı küt-uç oluşturacak şekilde; bazıları ise yapışkan-uç oluşturacak şekilde keser (69)

4.6.2.1. Yapışkan Uçlu "Sticky-end" Klonlama

Bu yöntemde, PZR ürünleri ve klonlanlama vektörü klonlamadan önce restriksiyon enzimleriyle kesilmelidir. Restriksiyon enzimlerinin bazıları (örneğin *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*), DNA parçalarının ucunda uzanan tek zincirli kuyruklar (yapışkan uçlar) oluşturacak şekilde DNA'yı keserler (Şekil 7) (69).



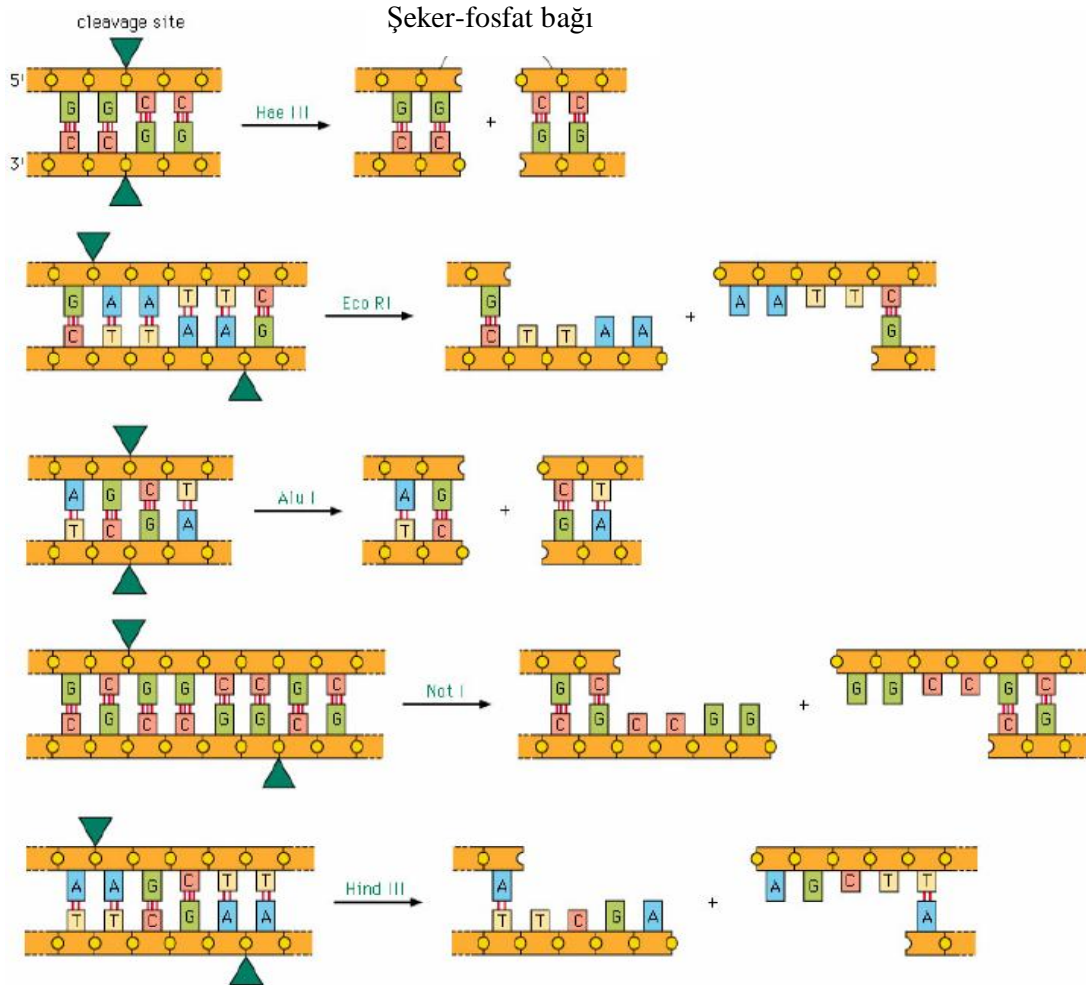
Şekil 7. EcoRI Restriksiyon enzim kesimi (EcoRI enzimi DNA'da 6 bazlık bölgeden ve G/A arasından karşılıklı (asimetrik) olarak keser) (69)

DNA parçalarının ucunda uzanan tek zincirli kuyruklar (yapışkan-uçlar) diğer DNA zincirindeki tamamlayıcı (komplementer) olan tek zincirli kuyruklar ile tekrar birleşebilir. Farklı iki kaynaktan elde edilen bu tür DNA parçaları uygun koşullarda bir araya getirilirse hidrojen bağları ile komplementer yapışkan uçların birleşmesi sonucu rekombinant moleküller

oluşur. Bu aşamada DNA ligaz, DNA parçalarını kovalen bağ ile birleştirerek rekombinant DNA molekülleri oluşturur (69).

4.6.2.2. Küt Uçlu "Blunt-end" Klonlama

SmaI, *HaeIII*, *AluI* gibi restriksiyon enzimleri ise DNA'nın her iki ipliğini aynı noktadan keserler. İki DNA ipliğinin aynı baz çiftinden kesildiği durumlarda küt uçlu DNA parçaları oluşur (Şekil 8) (92,93).



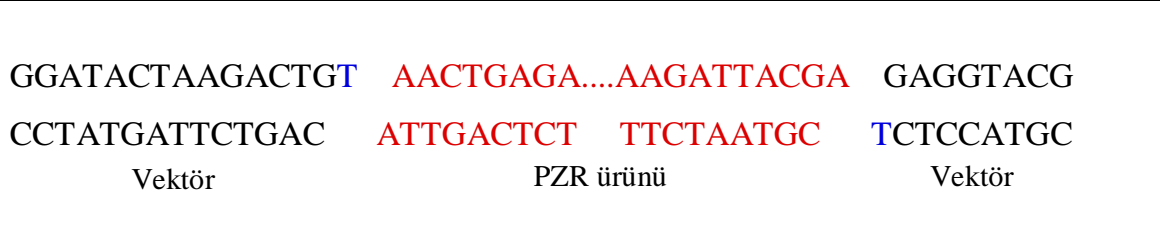
Şekil 8. Restriksiyon enzim kesimi (*Hae III* v e *Alu I* küt uçlu; diğerleri yapışkan uçlu kesim bölgeleri oluşturmaktadır) (93)

4.6.2.3. T/A Klonlama

T/A klonlama, PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan en basit ve en etkin yöntemdir (94). T/A klonlama sistemlerinin diğer klonlama sistemlerine göre başlıca avantajı basamak

sayısının daha az olması, dolayısıyla maliyetinin daha düşük ve daha kolay uygulanabilir olmasıdır. Bu yöntemde restriksiyon endonükleaz enzimlerine gerek duyulmamaktadır (95). PZR aşamasında genellikle Taq DNA polimeraz kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan, ayrıca PZR sırasında amplifiye olan DNA moleküllerinin 3' uçlarına adenin (A) nükleotidi eklenmesiyle sonuçlanan terminal deoksिनükleotid transferaz (TdT) aktivitesine sahip olan bir enzimdir (94,89). Bu nedenle, Taq DNA polimeraz ile çoğaltılan PZR ürünlerinin çoğu 3' ucunda bir A uzantısı taşır (94). Buna karşın, Pfu DNA polimeraz terminal transferaz aktivitesi göstermez. 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Küt uçlu PZR ürünleri oluşturur. Ancak, küt uçlu DNA parçaları da Taq DNA polimeraz ve dATP ile kısa bir inkübasyondan sonra, 3'-A ucuna sahip olan çift iplikli DNA molekülüne dönüştürülebilir (94).

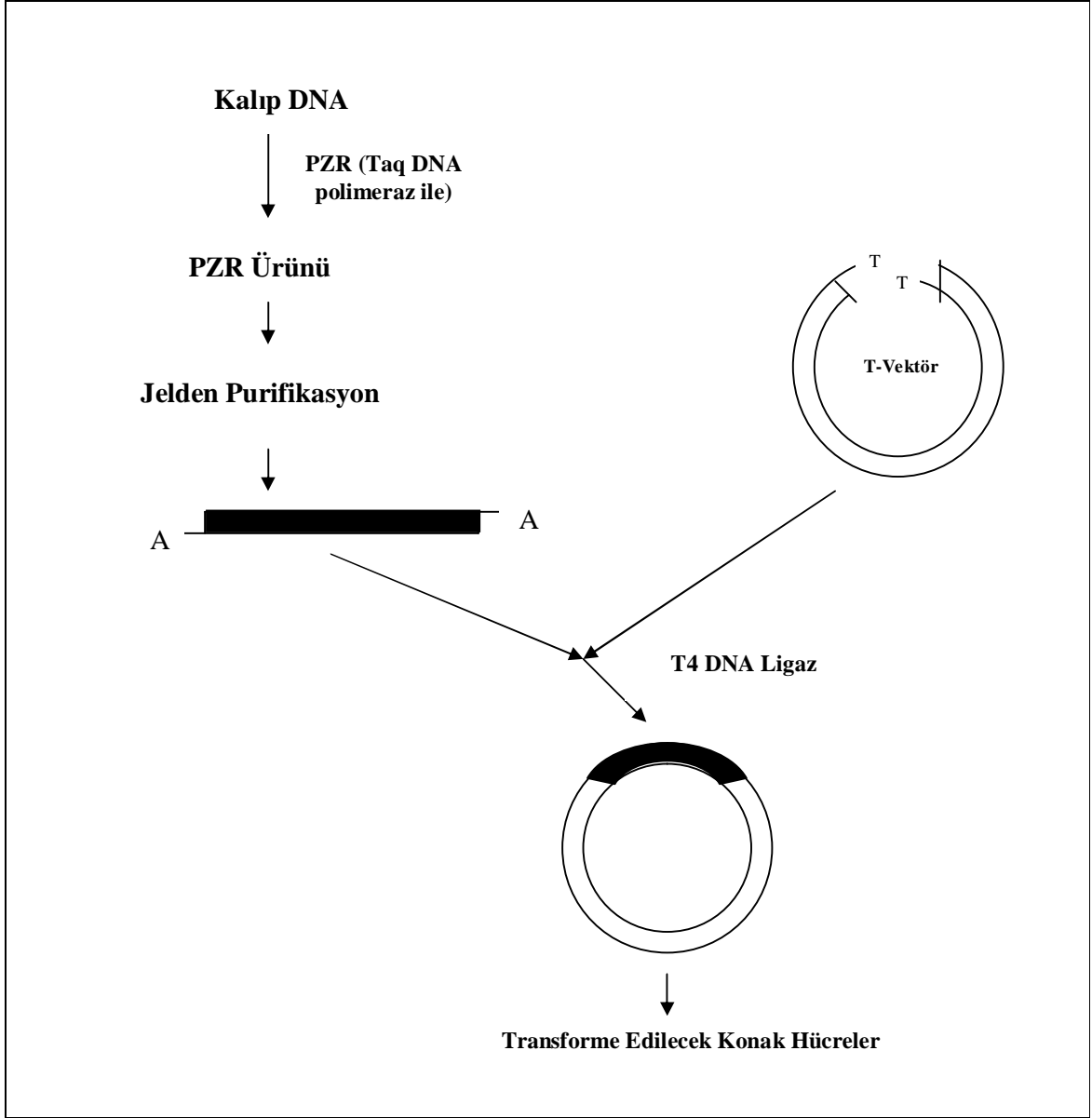
Bu şekilde elde edilen 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PZR ürünleri, komplementeri olan 3'-T uzantılı bir vektöre klonlanabilir. Böyle vektörler genellikle T vektör olarak adlandırılmaktadır. T vektör ve PZR ürünlerinin komplementer uçları DNA ligaz enzimi ile birleştirilerek rekombinant DNA molekülleri oluşturulur (Şekil 9)(94).



Şekil 9. A uzantısına sahip çift iplikli PZR ürünü ile T uzantılı vektör (94)

Şekil 9'da Taq DNA polimeraz ile hazırlanan PZR ürünü kırmızı renkte gösterilmektedir. Ürün, 3' ucunda A nükleotidine sahiptir. Vektör kolları ise T ile sonlanmıştır. Böylece PZR ürününün 3'-A uzantıları ile T vektörün 3'-T uzantıları arasındaki uyum, T-vektör içine Taq ile amplifiye edilmiş PZR ürünlerinin direk ligasyonunu sağlamaktadır (94).

T/A klonlamanın basamakları Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. TA klonlamanın şematik olarak aşamaları (94)

4.6.2.1.1. T/A Klonlamada PZR Ürününün Vektör İçine Klonlanması ("DNA Ligasyon" Aşaması)

Klonlanacak DNA (PZR ürünü), vektördeki hedef bölgeye DNA ligaz enzimi ile bağlanır. DNA ligaz enzimleri, polinükleotid zincirlerinden birinin 5' ucuyla diğer polipeptid zincirinin 3' ucu arasında kovalen bağ oluştururlar. Bu enzimler, 5' ucunda bir fosfat grubuna sahip olan dsDNA molekülünün bir ipliğindeki kırılmayı onarır. DNA ligaz enzimleri fosfat grubunun

aktifleşerek 3'-OH'a bağlanması için adenilatlanmış bir ajana gereksinim duyarlar. Bu işlem için *E. coli* enzimi NAD⁺ kullanır, çok yaygın kullanılan bakteriyofaj T4 enzimi ise ATP kullanır. Restriksiyon enzim reaksiyonunun tam tersine, ligazlar yapışkan uçların tutunmuş çiftindeki kırık olan fosfodiester bağları açığını kapatmada etkilidir (91,92).

4.6.2.1.2. Transformasyon Basamağı

Rekombinant DNA moleküllerinin konak hücrelere aktarılması işlemi genel olarak olarak transformasyon olarak adlandırılmaktadır (69).

Vektör olarak plazmidlerin (örneğin pTZ57R/T) kullanıldığı durumlarda alıcı hücre olarak bu plazmidlerin girebileceği uygun konak *E. coli* hücresi seçilir. Vektör ve PZR ürününün birleşmesinden oluşan rekombinant DNA moleküllerinin konak hücrelere aktarımında kimyasal, fiziksel, füzyon ve viral teknikler kullanılmaktadır. Genellikle bakteri hücrelerine gen aktarımında bakteri hücrelerinin DNA molekülünü hücre içine alabilme yeteneğinden yararlanılmaktadır. Soğuk CaCl₂ çözeltisinde bekletilmiş *E. coli* hücreleri kısa bir süre yüksek ısı şokuna maruz bırakılarak, kompetan (dış ortamdan DNA molekülü alabilme yeteneğinde) hale getirilmekte ve yabancı DNA'nın bu hücreler tarafından alınması sağlanmaktadır (91).

Transformasyon sonucunda hiçbir plazmid içermeyen *E. coli* 'ler, istenilen gen dizilerini içermeyen plazmidleri taşıyan *E. coli* 'ler ve istenilen gen dizilerini içeren plazmid vektörü taşıyan *E. coli* 'ler oluşabilir.

4.6.3. Rekombinant Molekülü Taşıyan Konak Hücrelerin Seçilmesi

İstenilen geni taşıyan plazmidli *E. coli* kolonilerini diğerlerinden ayırmak, gen aktarma tekniğinin en önemli bir aşamasını oluşturmaktadır. Bunu sağlamak için, koloni seçimi, koloni hibritleme, immunolojik yöntemle saptama gibi yöntemler kullanılabilir.

4.6.3.1. Koloni Seçimi

Transforme bakteriler ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren ortama aktarılarak bakterilerin üremesi sağlanır. Eğer klonlanan gen, plazmidin beta-galaktozidaz (*lac Z*) geni içine girmişse bu gen inaktive edildiğinden enzim sentezlenemediği için X-Gal'ı ayrıştıramaz ve koloniler renksiz (beyaz) olarak görülür. Klonlama ve transformasyon işlemi sonunda bu tür koloniler

(lak-, amp^r) seçilmektedir. Eğer beta-galaktozidaz geni inaktive olmamışsa sentezlenen enzim, X-Gal'ı ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir (lak+, amp^r dirençli koloniler) (91).

Gen transferinin doğruluğunu anlamak amacıyla besiyerinde üreyen kolonilerden beyaz olanları seçilerek hedef DNA'ya yönelik PZR'ları yapılır. Böylece transformant koloniler tespit edilir. Bazı durumlarda beyaz kolonilerden yapılan PZR'ların sonucu negatif çıkabilir. PZR saflaştırma işleminin başarısız olması, düşük antibiyotik konsantrasyonu, vektör DNA oranının PZR ürününe kıyasla daha yüksek olması "nonrekombinant" kolonilerin elde edilmesine neden olabilir (90).

4.6.4. Klonlanmış Genin Nükleotid Dizisinin Saptanması

DNA dizi analizi DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ile Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir (96).

a) Maxam-Gilbert Yöntemi: DNA parçası bir ucundan P32 ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört örnek olarak bölünür. Her örneğe, DNA'da ki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Daha sonra, piperidin kullanılarak, hasarlanmış nükleotidlerin bulunduğu yerlerden DNA yapısı fosfodiester bağlarından kırılır. Böylece P32 ile işaretlenmiş kısıklı-uzunlu parçalar elde edilmiş olur. Daha sonra elektroforez ve otoradyografi ile sonuç alınmaktadır (96).

b) Sanger DNA Dizi Analiz Yöntemi: En sık kullanılan Sanger'in yöntemi olup, asimetric amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikçili DNA; DNA polimeraz enzimi ile dideoksinükleotidler (ddNTP) ve biri radyoaktif olarak isaretlenmiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif P32, S35 veya P33 eklenir. İşaretleme primerlerle yapılabileceği gibi, ortama eklenen dNTP'lerden birisinin radyoaktif olması da yeterlidir. Burada en önemli nokta ddNTP'lerin (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) eklenmesidir. ddNTP'lerin dNTP'lerden farklılığı deoksiribozun 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Sentezlenen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler. Bu bağlanma 5' trifosfat grupları aracılığı ile olur. Fakat, 3' hidroksil grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağının oluşması engellenir. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkansız hale gelir (96).

DNA parçasındaki nükleotid dizisinin tayini için, her biri ayrı tüplerde olmak üzere 4 reaksiyon seti hazırlanır. Her tüpte tek zincirli bir DNA kalıbı (dizisi belirlenecek olan DNA), uygun bir primer, DNA polimeraz, dört nükleotid ve oransal olarak daha az miktarda dört tip ddNTP'lerden sadece biri bulunur. DNA sentezi olurken, DNA polimeraz, arada sırada, uzayan DNA zincirin yapısına nükleotidlerin yanı sıra ddNTP'leri de sokar. Bu nükleotid analogu 3' hidroksil grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile 3' bağı oluşturamaz. Bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her bir tüpte uzunlukları birbirlerinden birer nükleotid farklı olan değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki örnekler jel elektroforezine yan yana yüklenerek tüplerdeki DNA parçaları birbirlerinden ayrılır. Parçaların jel üzerinde görünüşleri sağlandığında merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar. Dizi aşağıdan yukarı doğru okunarak baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3' ne doğru nükleotid dizisi belirlenmiş olur (69).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. İzolatlar

Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2004 yılında kan kültürlerinden izole edilen ve GSBL üreten toplam 21 *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşu arasından farklı GSBL'ler üreten altı izolat seçildi ve bu izolatlar klonlama çalışmalarına alındı.

5.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

1. 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E5134) (pH 8.0)

186.12 g disodyum etilen diamin tetra asetat-2H₂O 800 ml distile su içinde karıştırılarak eritildi. NaOH kullanılarak pH 8.0'e ayarlandı. Hacim bir litreye distile su ile tamamlandı.

2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X)

108 g Tris (Sigma T1503), 55 g borik asit (Applichem A2940), 900 ml distile su içinde çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E5134) (pH 8.0) eklendi ve hacim bir litreye distile su ile tamamlandı.

3. TE Tamponu (pH 8.0)

10 ml 1 M Tris (pH 8.0) ve 2 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) 800 ml distile su ile karıştırıldı. pH 8.0'e ayarlandı. Hacmi 1 litreye tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

4. Ampisilin

Mililitresinde 25 mg olacak şekilde 10 ml'lik stok ampisilin solusyonu hazırlamak için 0,25 g ampisilin tartıldı. 10 ml steril su ile karıştırıldı. Birer ml'lik alikotlandı ve -20°C'ye kaldırıldı.

5. Ampisilinli Luria Bertani (LB) Agar (50 µg/ml-100 µg/ml)

3.5 g LB agar (Sigma L2897) 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. 50-55 °C'ye kadar soğutulup, içine ampisilin eklendi. 50 µg/ml ampisilin için

100 ml'ye 200 µl, 100 µg/ml ampisilin için 100 ml'ye 400 µl ampisilin (25 mg/ml) eklendi. Plaklar +4°C'ye kaldırıldı.

6. Ampisilinli LB Sıvı Besiyeri

2 g LB sıvı besiyeri (Sigma L3022) 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 50-55°C'ye kadar soğutulup, içine ampisilin eklendi. 50 µg/ml ampisilin için 100 ml'ye 200 µl, 100 µg/ml ampisilin için 100 ml'ye 400 µl ampisilin (25 mg/ml) eklendi.

7. Terrific Broth (TB)

TB, plazmid taşıyan *E. coli* hücrelerini çoğaltmak amacıyla kullanılan yüksek oranda zenginleştirilmiş bir besiyeridir. LB sıvı besiyerine kıyasla daha fazla pepton ve maya özütü eklenmesi yüksek oranda plazmid elde edilmesini sağlamaktadır. TB, bu çalışmada TEM klonlarından plazmid eldesi için LB sıvı besiyeri yerine kullanılmıştır.

200 ml TB için

LB sıvı besiyeri	1 g
Maya özütü	3.8 g
Dipotasyum fosfat	1.88 g
Monopotasum fosfat	0.44 g

tartıldı ve 200 ml distile suda çözüldü. 0.8 ml glicerol(%100'lük) eklendi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

8. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (Fermentas R0402)

Mililitresinde 20 mg olacak şekilde 5 ml'lik stok X-gal solusyonu hazırlamak için 0,1gram X-gal tartıldı. Beş ml N-dimetilformamid eklendi. Steril mikrosantrifüj tüplerine birer mililitre olarak alikotlandı. -20°C'de saklandı.

9. IPTG (isopropyl – β-D-thiogalactopyranoside) (Fermentas R0391)

Mililitresinde 24 mg olacak şekilde 50 ml'lik stok IPTG solusyonu hazırlamak için 1,2 gram IPTG tartıldı. 50 ml distile su eklendi. Filtrasyon ile steril edildi. Steril mikrosantrifüj tüplerine birer mililitre olarak alikotlandı. +4°C'de saklandı.

10. Etidyum Bromid (Applichem A11511)

Etidyum Bromid	0.5 g
Distile su	100 ml

0.5 g etidyum bromid 100 ml distile suda çözüldü. Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı.

11. Liyofilize *Escherichia coli* JM107 Bakterilerin (Fermentas M0109) Hazırlanması

Liyofilize *E. coli* JM107 bulunan şişenin içine 0.5 ml LB sıvı besiyeri eklendi ve iyice karıştırıldı. LB ve kanlı agarlara 20 şer µl ekim yapıldı. Stoklamak için sıvı besiyerindeki süspansiyondan 100 µl beyin kalp sıvı besiyerine ilave edildi ve gliserol (% 50) eklenerek -20°C'ye kaldırıldı. Ayrıca ertesı gün kanlı ve LB agarlarda üreyen kolonilerden de stok kültürler hazırlandı.

5.3. PZR Ve Dizi Analizi İçin Kullanılan Öncüller

Çalışmalarda kullanılan öncül dizileri Tablo 3ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. PZR analizi için kullanılan öncüller

Öncüller	Ürün Büyükülüğü	Kaynaklar
CTX-1- 5'- CCCATGGTTAAAAAATCACTG -3' CTX-1- 5'- CCGTTTCCGCTATTACAAAC -3'	891	97
CTX-2-5'- ATGATGACTCAGAGCATTCGC -3' CTX-2 -5'- TCGCTCCATTTATTGCATCA -3'	893	97
CTX-8- 5'- ATGTTAATGACGACAGCCTGTG -3' CTX-8- 5'- CCGGTTTTATCCCCGACA -3'	689	97
CTX-9-5'- GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG -3 CTX-9-5'- ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC -3'	856	98
TEM-A-5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3' TEM-B-5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'	1080	99
SHV-A-5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC-3' SHV-B-5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC-3'	930	98

Tablo 4. Dizi analizi için kullanılan öncüller

Öncüller	Öncül dizileri (5'-3')	Konsantrasyon	Tm
M13F-pUC-F(-46)	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA	10 pmol/μl	58.6 °C
M13F-pUC-R(-46)	GAGCGGATAACAATTTACACAAGG	10 pmol/μl	55.7 °C
TEM-S1-F	TACTACTATTCTCAGAATGACT	10 pmol/μl	54 °C
TEM-S2-R	TTCTGTGACTGGTGAGTACT	10 pmol/μl	56 °C
SHV-S(LE)	CAGATCGGCGACAACGTCAC	10 pmol/μl	56.0 °C
SHV-S2(LA)	GTGACGTTGTCGCCGATCTG	10 pmol/μl	63.0 °C

5.4. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Üretiminin Saptanması

İzolatlarda GSBL varlığının saptanması amacıyla CLSI tarafından önerilen tarama ve doğrulama testleri kullanılmıştır (78). Doğrulama amacıyla kombine disk yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla test edilecek organizma Mueller-Hinton agar besiyerine (Oxoid, İngiltere) homojen olarak yayıldı. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) önerilerine göre sefotaksim (30 μg) ile sefotaksim kalvulanat (30 + 10 μg), seftazidim (30 μg) ile seftazidim klavulanat (30 + 10 μg) diskleri karşılıklı olarak yerleştirildi (76). Plak 37°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla 5 mm veya daha fazla ise, izolat GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edildi (78).

5.5. GSBL’lerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Saptanması

5.5.1. DNA Eldesi

İzolatların hangi tip GSBL yaptıklarını belirlemek amacıyla *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* PZR yapıldı. Bu amaçla suşlardan DNA eldesi için, 500 μl distile su bulunan mikrosantrifüj tüpleri içinde 2- 3 bakteri kolonisi süspanse edildi. Kaynatılmış suda 15 dakika bekletildi. 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüje edildi. Üst kısımlar yeni steril tüplere alınarak PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı (100).

5.5.2 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması

E. coli ve *K. pneumoniae* suşlarının DNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aşamasına geçildi. Suşların CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, TEM, SHV PZR'ları yapıldı.

5.5.2.1.CTX-M-1 PZR

Her bir örnek için PZR tüplerine, buz üstünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu.

Master mix

10x <i>Taq</i> Tamponu	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon (Fermentas R0181, Litvanya)	200µM (4x25µmol)	4 µl
MgCl ₂	1.5 mM	3 µl
CTX1A primeri	20 pmol	1 µl
CTX1B primeri	20 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz (Fermentas EP0402, Litvanya)	2 U	0.4 µl
dH ₂ O	30.6 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü ⇒Tm1: 49.1 °C Tm2: 49.5 °C
94 °C→1dakika	denatürasyon	
48 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→20 dakika	son uzatma	

5.5.2.2.CTX-M-2 PCR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon	200µM (4x25µmol)	4 µl
MgCl ₂	1.5 mM	3 µl
CTX2A primeri	20 pmol	1 µl
CTX2B primeri	20 pmol	1 µl

<i>Taq</i> DNA polimeraz	2 U	0.4 µl
dH ₂ O	30.6 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon		
94 °C→1dakika	denatürasyon	} ⇒30 döngü	⇒Tm1 :51.7 °C Tm2:56 °C
50 °C→1dakika	birleşme		
72 °C→2dakika	uzama		
72 °C→10 dakika	son uzatma		

5.5.2.3. CTX-M-8 PCR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon	200µM (4x25µmol)	4 µl
MgCl ₂	1.5 mM	3 µl
CTX8A primeri	20 pmol	1 µl
CTX8B primeri	20 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	2 U	0.4 µl
dH ₂ O	30.6 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon		
94 °C→1dakika	denatürasyon	} ⇒30 döngü	⇒Tm1 :51.8 °C Tm2:56 °C
50 °C→1dakika	birleşme		
72 °C→2dakika	uzama		
72 °C→10 dakika	son uzatma		

5.5.2.4. CTX-M-9 PCR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon	200µM (4x25µmol)	4 µl
MgCl ₂	1.5 mM	3 µl

CTX9A primeri	20 pmol	1 µl
CTX9B primeri	20 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	2 U	0.4 µl
dH ₂ O	30.6 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü ⇒Tm1:52.2°C Tm2:60.1 °C
94 °C→1dakika	denatürasyon	
52 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→10 dakika	son uzatma	

5.5.2.5. TEM PZR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon	200µM (4x25µmol)	4 µl
MgCl ₂	1.25 mM	2.5 µl
TEM-A primeri	20 pmol	1 µl
TEM-B primeri	20 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	2.5 U	0.5 µl
dH ₂ O	31 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü ⇒Tm1:42.6 °C Tm2:48.5 °C
94 °C→1dakika	denatürasyon	
42 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→20 dakika	son uzatma	

5.5.2.6. SHV PZR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 µl
dNTP stok solüsyon	200µM (4x25µmol)	4 µl

MgCl ₂	1.25 mM	2.5 µl
SHV-A primeri	20 pmol	1 µl
SHV-B primeri	20 pmol	1 µl
Taq DNA polimeraz	2.5 U	0.5 µl
dH ₂ O	31 µl	
DNA	5 µl (1/10 sulandırılmış)	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü ⇒Tm1:47.7 °C Tm2:50.3 °C
94 °C→1dakika	denatürasyon	
47 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→20 dakika	son uzatma	

1.1.1. 5.5.3 Agaroz Jel Elektrofrez ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PZR sonuçlarını görebilmek için %2'lik jel hazırlandı. Bunun için 40 ml Tris-Borik asit-EDTA (TBE 1X) (pH:8) içine 0.8 g agaroz (PeqLab 35-1020)eklenerek mikrodalga fırında eritildi. İçine 3 µl etidyum bromid (5mg/ml) eklendi. Tarakları hazırlanmış kalıba döküldü. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak jel, elektroforez tankına yerleştirildi. İki µl jel yükleme tamponu (Fermentas R0611, Litvanya) ve 10 µl PZR ürünü karıştırılarak her kuyucuğa 12 µl yüklendi. Ayrıca bant büyüklüğünü görebilmek amacıyla bir kuyuya da marker (100bp DNA ladder) (Fermentas SMO241, Litvanya) konuldu. Jel 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH: 8) içinde 120 volt uygulanarak 45 dakika yürütüldü ve ardından ultraviyole aydınlatıcıda (BIO-ID++, Almanya) incelenerek bantlar görüntülendi.

5.6. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Klonlama da PZR ürününün saflığı önemli olduğu için öncelikle PZR ürününü saflaştırma işlemi yapıldı. Bunun için jelden DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı (Fermentas K0513, Litvanya). Üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde işlem gerçekleştirildi. Y Agaroz jelde ürün yürütüldükten sonra, DNA bantları UV üzerinde bistüri ile kesildi. Bantların etrafındaki jel mümkün olduğunca ürüne dokunulmadan uzaklaştırıldı. Daha sonra ürün hassas tartı kullanılarak tartıldı ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Y Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için jelin hacminin 1/2 si kadar TBE yoğun tuz içeren dönüştürme tamponu, 4^{1/2} katı kadar Binding Tampon (Bağlama çözeltisi) eklendi. Agarozu eritmek amacı ile 55°C'de 5 dakika su banyosunda bekletildi.

Y Agaroz eridikten sonra silika toz süspansiyonu ilave edildi. Bunun için 2.5 µg DNA'ya 5 µl silika toz süspansiyonu konuldu (Eğer DNA 2.5 µg'dan fazla ise her 1µg DNA fazlalığına karşılık 2 µl silika ilave edildi). 55°C'de 5 dakika su banyosunda bekletildi. Her 2 dakikada bir vorteks karıştırıcıda 4-5 saniye tutuldu.

Y Bu karışım 5 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst kısım atıldı. 500 µl soğuk yıkama tamponu eklendikten sonra vorteks karıştırıcıda 5-6 saniye tutuldu. 5 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her yıkamada dipteki çözeltinin tamamen çözünmesi sağlandı. Son yıkamadan sonra, üst kısım uzaklaştırıldı.

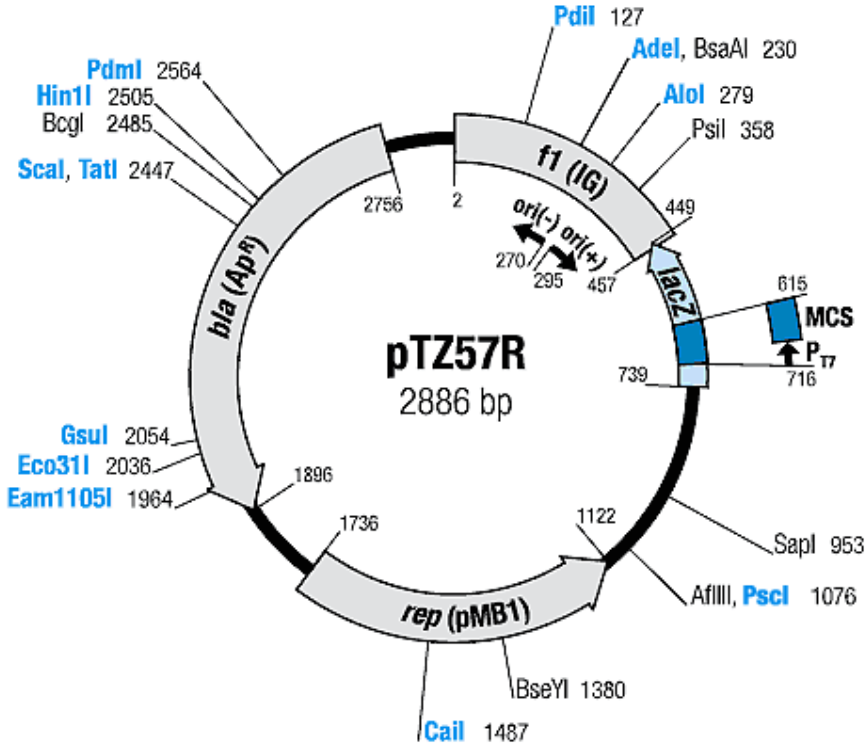
Y Çökeltinin kuruması için havada yaklaşık 10-15 dakika beklendi.

Y Çökelti 20 µl steril distile su ile süspanse edildi. 55°C'de 5 dakika tutulduktan sonra 30 saniye 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım yeni bir tüpe alındı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

5.7. PZR Ürününün Klonlanması

Klonlama için InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas K1214) kullanıldı.

Bu kit TA klonlama için kullanılmaktadır. 3'-A uzantısına sahip amplifiye çift iplikli PZR ürünleri komplementeri olan 3'-T uzantılı vektöre klonlanmaktadır. Vektör ve PZR ürünlerinin komplementer uçları DNA ligaz enzimi ile birleştirilerek rekombinant DNA molekülleri oluşturulur (89).



Şekil 11. pTZ57R Klonlama Vektörü (89)

Sekanslanacak PZR ürünü vektörün *lacZ* geni içindeki Çoklu Klonlama Bölgesi (MCS) "Multiple Cloning Sites" içine girmektedir (Şekil 10) (89).

Kitin içerisinde

- Vektör pTZ57R/T
- T4 DNA Ligaz
- 5X Ligasyon Tamponu
- Kontrol PZR Fragmenti
- Kontrol DNA
- Vektör pTZ57R DNA
- dH₂O
- TransformAid™ Bakteriyel Transformasyon Sistemi:
 - C-Besiyeri
 - T-Çözeltisi (A)
 - T- Çözeltisi (B) bulunmaktadır (86).

5.7.1. Ligasyon

Ligasyon basamağında T4 DNA Ligaz enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim diğer ligazlardan farklı olarak ATP kullanır ve az da olsa küt uçlu ürünleri de birbirine bağlama özelliğine sahiptir. Ligasyonda plazmitin T bazı eklenmiş açık uçları ile PZR ürününün A bazı eklenmiş uçları karşılıklı gelerek yapışır. Uygun ortamın oluşturulması ve T4 DNA Ligazın ATP kullanabilmesi amacıyla ortama ligazın kendi tamponu konur. Ligaz enzimi ile vektör ve hedef DNA'nın 5'P ve 3'OH grupları kovalen olarak bağlanır.

Ligasyon etkinliğinde önemli faktörlerin başında PZR ürünün saflığı gelmektedir. PZR ürünü yeterli oranda saf ise PZR ürünü ligasyon reaksiyonunda kullanılabilir. Saflaştırılmamış PZR ürünlerinin kullanımı klonlama veriminin düşmesine neden olur. Ligasyon için uygun DNA parçaları agaroz jelden saflaştırma, ultrafiltrasyonla ya da kromatografi ile hazırlanabilir. Bu çalışmada jelden saflaştırma yöntemi kullanılmıştır.

Ligasyonun etkinliğinde kritik önem taşıyan bir başka faktör PZR ürünlerinin 3' sonlarına eklenen T nükleotidi miktarıdır. Bu nedenle PZR amplifikasyonun uzama basamağı 70-72°C de 20-30 dakika olacak şekilde ayarlanmaktadır. Bu işlem genellikle 3-4 kat daha yüksek düzeyde rekombinant kolonilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Ligasyonun etkinliğini etkileyen bir başka faktör ise ligasyon reaksiyonundaki vektör/klonlanacak olan gen parçası "insert" oranıdır. Bu oran, yaklaşık 1/3 olmalıdır (86).

Ligasyon Reaksiyonu

PZR tüplerine aşağıdaki malzemeler sırasıyla konuldu.

Ligasyon Karışımı	Miktar
Vector pTZ57R/T,(0.165µg,0.18pmol)	3µl
Saflaştırılmış PCR ürünü (yaklaşık0.54pmol)	4µl
5x Ligasyon Tampon	6µl
dH ₂ O	16µl
T4 DNA ligaz, 5u	1 µl
Toplam	10µl

15°C' de 18 saat bekletildi.

5.7.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

Transformasyon öncesi besiyerlerinin hazırlanmış olması gerekmektedir. Bu amaçla ampisilinli ve ampisilinsiz LB agar ve sıvı besiyerleri sayfa 38 ve 39 da belirtildiği şekilde hazırlandı.

5.7.3. Transformasyon İşlemi

5.7.3.1. Kompetan Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Y Kompetan bakteri stoğundan (*E. coli* JM107) LB plağa ekim yapılarak bir gece (16-18 saat) 37°C'de inkübe edildi. Her transformasyon için 1.5 ml TransformAid™ C-Besiyeri de aynı sürelerde 37°C'de tutularak ısıtıldı.

Y Bir gece boyunca etüvde bekleyen LB agar plaklarında üreyen bakterilerden birkaç koloni steril özeye 1.5 ml C-Besiyeri'ne ilave edildi. Kültür hafifçe karıştırılarak süspansiyon edildi ve tüpler 37°C'de etüvde çalkalanarak 2 saat inkübe edildi (86).

5.7.3.2. Bakteri Kültüründen Bakterilerin Hazırlanması

Y İki ml TransformAid™ C-Besiyeri'ne *E. coli* JM107 kompetan bakteri kolonileri inokule edildi. Tüp etüvde 37°C'de sürekli 200 rpm devirde çalkalanarak 16-18 saat bekletildi.

Y Her transformasyon reaksiyonu için ayrıca 1.5 ml TransformAid™ C-Besiyeri de 37°C'de 16-18 saat tutularak ısıtıldı.

Y Her 1.5 ml C-Besiyeri'ne 0.15 ml 16-18 saat etüvde bekleyen kültürden eklendi. Tüpler 37°C'de etüvde çalkalanarak 20 dakika bekletildi (86).

5.7.3.3. Transformasyon İçin Gerekli Besiyerlerinin Hazırlanması

Her ligasyon ürünü için 2-3 ampisilinli LB-agar hazırlandı. Besiyerlerinin her birine ekimden 30-45 dakika önce, önceden hazırlanmış olan 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve 40 µl X-gal (20 mg/ml) eklendi ve plak üzerine yayıldı. Besiyerleri IPTG ve X-Gal'in içine geçmesi için ters bekletildi.

5.7.3.4. Transformasyon

Y LB-ampisilin agar plaklar en az 20 dakika 37 °C'de bekletildi.

- Her bir transformasyon için 500 µl T-solusyon-(A) ve 500 µl T-solusyon-(B) karıştırılarak TransformAid™ T-Besiyeri hazırlandı. T-Besiyeri buz üzerinde bekletildi.
- Kompetan bakteri kültürlerinin hazırlanması basamağında elde edilen ve 37°C'de tutulmakta olan sıvı besiyerindeki kültürler 2 saatin sonunda +4°C de 1 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım atıldı ve 300 µl T-Besiyeri eklenerek süspanse edildi. Beş dakika buzda bekletildi.
- Tekrar +4°C de 1 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve 120 µl T-Besiyeri eklenerek süspanse edildi.
- Süspansiyon 5 dakika buzda bekletildi.
- Her bir steril mikrosantrifüj tüpü içerisine, süspanse edilmiş 50 µl kompetan hücre süspansiyonu eklendi. Beş dakika buzda bekletildi.
- Kontrol transformasyonu için; kontrol ligasyon ürününden 2 µl bir steril mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi.
- Ligasyon ürünlerinden 2.5 µl diğer mikrosantrifüj tüplerine konularak 2 dakika buzda bekletildi.
- IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli LB besiyerlerine kontrolden 100 µl, diğer transformasyon tüplerinden klonlama etkinliğini değerlendirme amacıyla 200µl, 100µl, 50µl ekim yapıldı. 37 °C de bir gece (16-18 saat) bekletildi (86).

5.7.3.5 Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi

Plazmidin beta-galaktozidaz (*lac Z*) geni içine klonlanan genin girmesi ile bu gen inaktive edildiğinden transforme bakteriler ampisilin ve X-Gal içeren ortama aktarıldığında ürer; ancak, enzim sentezlenemediği için X-Gal'ı ayrıştıramaz ve koloniler renksiz (beyaz) olarak görülür. Klonlama ve transformasyon işlemi sonunda bu tür koloniler (*lac*⁻, *amp*^r) seçilmektedir. Eğer beta-galaktozidaz geni inaktive olmamışsa sentezlenen enzim, X-Gal'ı ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir (*lac*⁺, *amp*^r dirençli koloniler). Bunlar plazmidi (vektörü) almış ancak klonlama gerçekleşmemiş olan bakterilerdir.

Bu çalışma da, klonlama işlemleri sonucunda *lac Z* repressörü inaktive eden IPTG ve X-Gal (kromojenik β-galaktozidaz substratı) kullanılarak klonlanan PZR ürünü içeren bakteri kolonileri renksiz, şeffaf ("beyaz koloni"); içermeyenler mavi görünüşleri ile ayırt edildi.

Plazmid vektör ampisilin direnç geni de taşıdığı için koloni seçimi amacıyla kullanılacak besiyerlerine ayrıca ampisilin de eklendi.

Besiyeri üzerine yayılan IPTG (*lac Z* represörünü inaktive eder) ve X-Gal (beta-galaktozidaz enziminin substratı) maddeleri ile hedef bölgeyi içeren koloniler beyaz, içermeyenler ise mavi renkte görüldü. Bunun yanı sıra plazmid ampisilin direnç geni taşıdığı için sadece plazmide sahip koloniler ampisilinli besiyerinde üredi.

Transformasyon sonrası LB agarların fotoğrafları çekildi ve oluşan koloniler sayıldı, kolonilerin pasajları yapıldı. Farklı oranlarda ekim yapılan besiyerlerindeki beyaz koloniler sayılarak transformasyon verimliliği de hesaplandı.

$$\text{Transformasyon verimliliği (\%)}: \frac{\text{Beyaz koloni sayısı} \times 100}{\text{Tüm koloni sayısı}}$$

5.7.4 Klonlanmanın Doğrulanması Amacıyla Kolonilerden PZR ile *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}'nin Saptanması

Gen transferinin doğruluğunu anlamak amacıyla transforme bakteri kolonileri kullanılarak PZR ile klonlanan *bla* geni araştırıldı. Ampisilinli besiyerinde üreyen kolonilerden beyaz olanları steril kürdan yardımıyla seçilerek PZR'ları yapıldı. Böylece transformant koloniler tespit edildi. Bu koloniler steril kürdanla alınarak 900 µl beyin kalp sıvı besiyeri içeren mikrosantrifüj tüplerine inokule edildi. İnokulasyondan sonra bir gece 37 °C'de bekletildi. Üzerlerine 100 µl % 50'lik steril gliserol eklenerek -80 °C'ye kaldırıldı. Her bir suştan üç klon stoklandı.

CTX-M-1 klonlarından CTX-M-1 PZR, TEM klonlarından TEM PZR, SHV klonlarından SHV PZR çalışıldı. PZR ürünleri -20°C'de saklandı.

5.8. Plazmid DNA Eldesi

Klonlanan genin varlığını gösterecek dizi analizi öncesi klonlardan plazmid izolasyonu yapıldı. Bu amaçla "GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit" (Fermentas, Litvanya) kullanıldı ve aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulandı:

CTX-M-1, SHV ve TEM klonlarından ikisi seçilerek plazmid ekstraksiyonu yapıldı.

CTX-M-1 ve SHV klonları için

- 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerleri hazırlandı.
- Steril cam tüplere üçer ml ampisilinli LB sıvı besiyeri aktarıldı.
- İçlerine plaklardan seçilen koloniler inokule edildi.
- 16 saat 37°C'de bekletildi.

TEM klonları için

- 50 µg/ml ampisilin içeren Terrific Broth (TB) sıvı besiyeri hazırlandı.
 - Steril cam tüplere 5'er ml ampisilinli TB aktarıldı.
 - İçlerine plaklardan seçilen koloniler inokule edildi.
 - 16 saat 37 °C'de bekletildi.
- Daha sonra bu sıvı kültürlerden plazmid DNA eldesi için "GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit" kullanıldı.
- Kültürler 8.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst kısım atıldı.
 - 250 µl Resüspanسیون Çözeltisi eklendi. Pellet tamamen çözünene kadar vorteks karıştırıcıda süspanse edildi.
 - 250 µl Lizis Çözeltisi eklendi. Tüp 4- 6 kez alt üst edilerek karıştırıldı.
 - 350 µl Nötralizasyon Çözeltisi eklendi. Tüp 4- 6 kez alt üst edilerek karıştırıldı.
- 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Üst kısım bir başka tüp (toplama tüpü) içerisine yerleştirilmiş GeneJet™ spin kolonlarına aktarıldı. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpünün içeriği atıldı.
 - GeneJet™ spin kolonuna 500 µl Yıkama Tamponu eklendi. 11.000 rpm'de 60 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpünün içeriği atıldı. 500 µl Yıkama Tamponu kullanarak yıkama prosedürü tekrar edildi.
 - Silika membranı kurutmak amacıyla tekrar 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
 - Son basamaktan sonra GeneJet™ spin kolonu 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 50 µl elüsyon tamponu eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak kolon atıldı. Mikrosantrifüj tüpündeki saflaştırılmış plazmid DNA -20°C'de saklandı.

Y Plazmid ekstraktları % 0.8'lik agaroz jelde 120 voltta 1 saat yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntüledi. Aynı jelde λ DNA/Hind III (Fermentas ,Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

5.9. Klonlardan M13F-pUC-F, M13F-pUC-R Primerleri ile PZR

Plazmid DNA'sını elde ettiğimiz iki CTX-M klonunun jel ekstraktlarından M13 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. M13 primerleri kullanılarak hem hedef DNA hem de plazmide ait bir kısım dizi incelenmektedir.

M13/pUC-F(-46)

5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'

M13/pUC-R(-46),

5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

5.9.1. M13 PZR

Master mix

10x <i>Taq</i> Tampon	1x	5 μ l
dNTP stok solüsyon	200 μ M (4x25 μ mol)	4 μ l
MgCl ₂	1.5 mM	3 μ l
M13F-pUC-F	20 pmol	1 μ l
M13F-pUC-R	20 pmol	1 μ l
<i>Taq</i> DNA polimeraz	2 U	0.4 μ l
dH ₂ O	30.6 μ l	

Isı döngü programı

94 °C→3dakika	ön denatürasyon	} ⇒30 döngü ⇒Tm1:58.6 °C Tm2:55.7 °C
94 °C→1dakika	denatürasyon	
54 °C→1dakika	birleşme	
72 °C→2dakika	uzama	
72 °C→10 dakika	son uzatma	

5.10. DNA Dizi Analizi

Seçilen suşlardan *bla_{ctx-m}*, *bla_{tem}*, *bla_{shv}* genlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi için dizi analizi yaptırıldı. Dizi analizi işlemi MacroGen-Güney Kore firmasınınca gerçekleştirildi. Dizi analizi için kullanılan primerler Tablo-4’de gösterilmektedir.

66-23, 94-10 numaralı CTX-M-1 klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R ve CTX-M-1 primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Böylelikle toplam 8 dizgi elde edildi.

155-2, 200-1 numaralı SHV klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R, SHV-S(LE)-F, SHV-S2(LA)-R, SHV-F, SHV-R primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Böylelikle toplam 12 dizgi elde edildi.

91-3, 94-7 numaralı TEM klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R, TEM-S1-F, TEM-S2-R, TEM-F, TEM-R primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Böylelikle toplam 12 dizgi elde edildi.

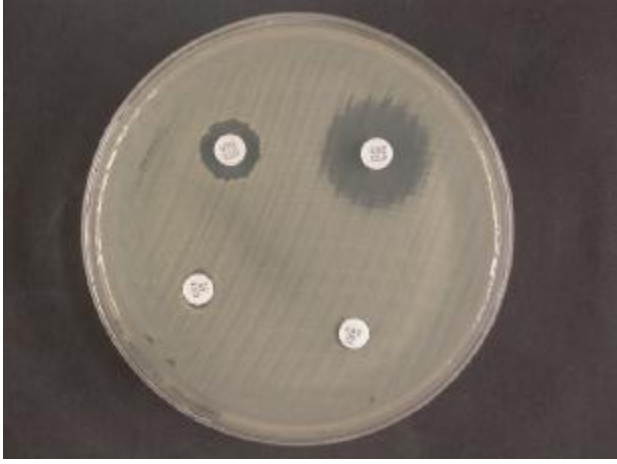
Dizi analizi sonuçları çeşitli referans dizgileriyle Clustal X programında, aminoasit dizileri ise Mega 3.1 programı kullanılarak karşılaştırıldı.

Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesi uygulanarak ise filogenetik ağaçları elde edildi.

6. BULGULAR

6.1. Kombine Disk Yönteminin Sonuçları

Çalışmaya alınan toplam 21 suşta GSBL pozitifliği saptandı.



Şekil 12. GSBL paterni gösteren bir *K. pneumoniae* suşu

6.2. PZR Sonuçları

PZR sonucu CTX-M-1 pozitif olan suşların sayısı 18, TEM pozitif olan suşların sayısı 11, SHV pozitif olan suşların sayısı 9 olarak saptandı (Tablo 5). CTX-M, TEM ve SHV tipi beta-laktamazları bir arada taşıyan 4 *K. pneumoniae*, CTX-M ve TEM beta-laktamazı taşıyan 7 *K. pneumoniae* ve 4 *E. coli*, CTX-M ve SHV beta-laktamazı taşıyan 2 *K. pneumoniae* suşu bulunmaktadır.

CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 gruplarına ait beta-laktamazlar ise saptanmadı.

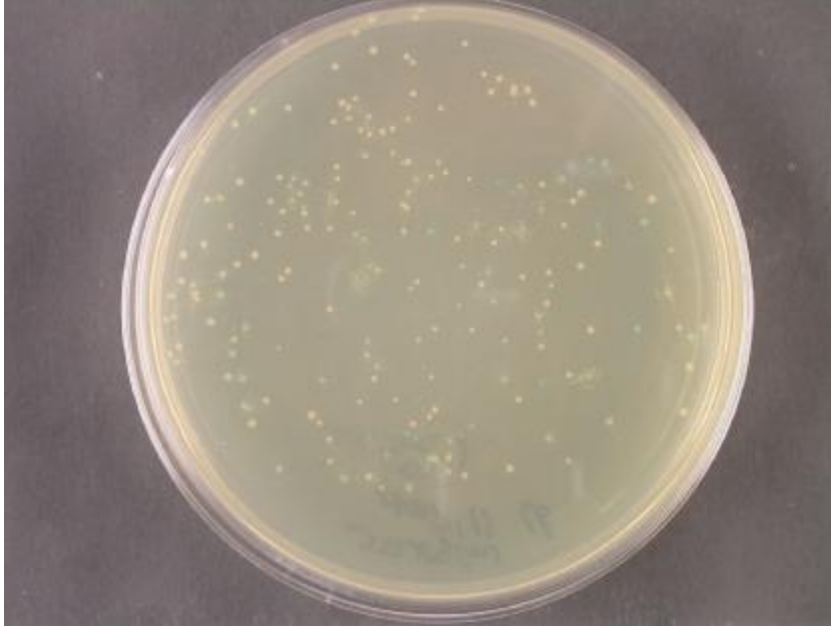
Tablo 5. PZR sonucu CTX-M, SHV ve TEM pozitif olan suşlar

	CTX-M	SHV	TEM
<i>E.coli</i> (9)	9	-	4
<i>K.pneumoniae</i> (12)	9	9	7

6.3. PZR Ürünlerinin Klonlanması

6.3.1. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçilmesi

PZR ürününü alan vektörlerde *lacZ* geni inaktive edildiği için laktoz negatif, beyaz koloniler; PZR ürününü almayan vektörlerde ise laktoz pozitif mavi koloniler oluşmuştur. Transformasyon sonrası elde edilen koloni görüntüleri Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Mavi ve beyaz kolonilerin görünümü

6.3.2. Transformasyon Verimliliği

Transformasyon sonrası farklı oranlarda ekim yapılan besiyerlerindeki beyaz koloniler sayılarak transformasyon verimliliği hesaplandı. Transformasyon verimliliği Tablo 6’da gösterilmektedir.

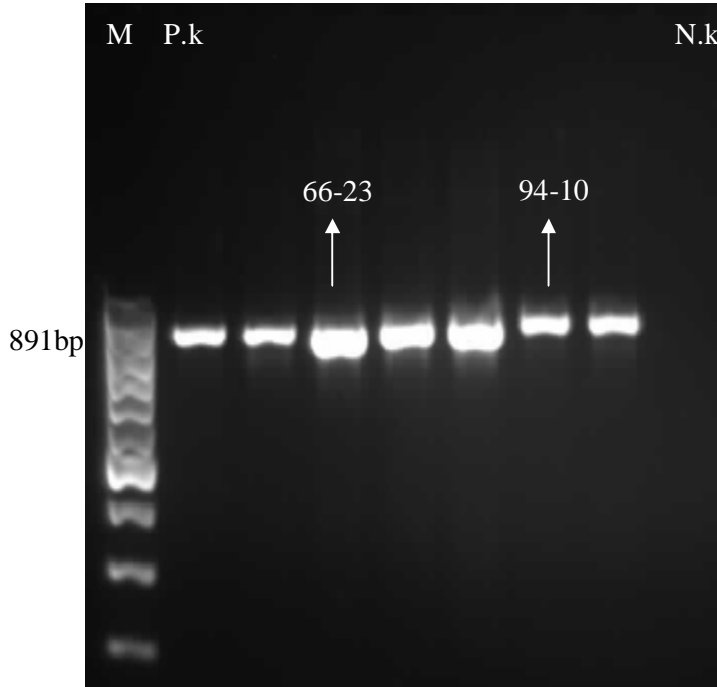
Tablo 6. Transformasyon verimliliği

	Klon no	Klonlanan gen	Transformasyon verimliliği
1	66	<i>bla_{CTX-M}</i>	% 73
2	94	<i>bla_{CTX-M}</i>	% 67.4
3	155	<i>bla_{SHV}</i>	% 74.2
4	200	<i>bla_{SHV}</i>	% 82.5
5	91	<i>bla_{TEM}</i>	% 72.6
6	94	<i>bla_{TEM}</i>	% 75

6.3.3. Klonlanmanın Doğrulanması Amacıyla Kolonilerden PZR ile *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}'nin Saptanması

Doğru genlerin klonlandığının anlaşılması amacıyla koloni PZR yapıldı.

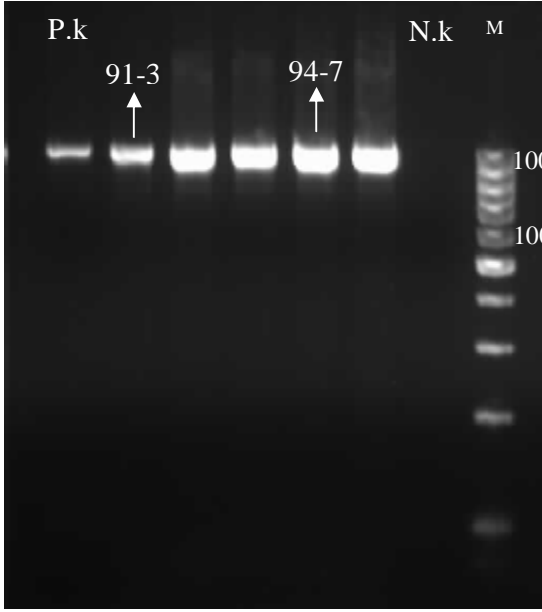
CTX-M-1 klonlarından *bla*_{CTX-M-1} PZR, TEM klonlarından *bla*_{TEM} PZR, SHV klonlarından *bla*_{SHV} PZR çalışıldı. Klonların aktarılan gen açısından pozitif olduğu bulundu. Sonuçlar Şekil 14,15,16'da gösterildi.



Şekil 14. 66-23, 94-10 numaralı klonların CTX-M-1 PZR sonrası bant görüntüleri.

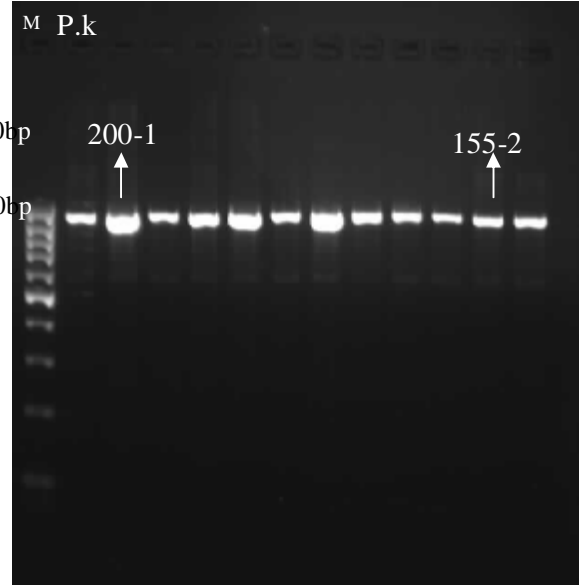
M: DNA marker-100bp (Fermentas SM0241), P.k: Pozitif kontrol, N.k: Negatif kontrol.

Pozitif kontrol ile aynı hizada 891 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. 66-23 ve 94-10 numaralı klonlar aktarılan gen açısından pozitif bulunarak dizi analizi uygulaması için seçildi.



Şekil 15. 91-3, 94-7 numaralı klonların TEM PZR jel görüntüsü.

Pozitif kontrol ile aynı hizada yaklaşık 1000 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. 91-3 ve 94-7 numaralı klonlar aktarılan gen açısından pozitif bulunarak dizi analizi uygulaması için seçildi.



Şekil 16. 200-1, 155-2 numaralı klonların SHV PZR jel görüntüsü.

Pozitif kontrol ile aynı hizada 930 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. 200-1 ve 155-2 numaralı klonlar aktarılan gen açısından pozitif bulunarak dizi analizi uygulaması için seçildi.

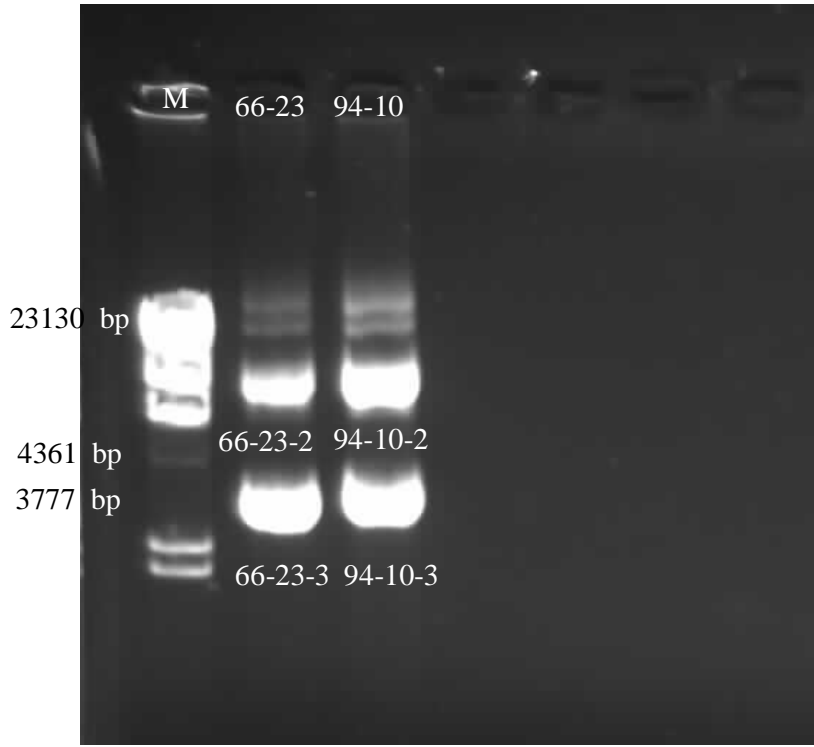
6.4. Klonlardan Elde Edilen Plazmidlerin *bla* Gen Ürünleri Açısından İncelenmesi

LB Broth ve Terrific Broth kültürleri ile yapılan kolonilerden “GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit” kullanılarak plazmid DNA elde edildi.

CTX-M klonlarından iki tanesinin(66-23, 94-10), SHV klonlarından iki tanesinin (155-2, 200-1) ve TEM klonlarından iki tanesinin (91-3, 94-7) plazmid DNA’ları elde edildi.

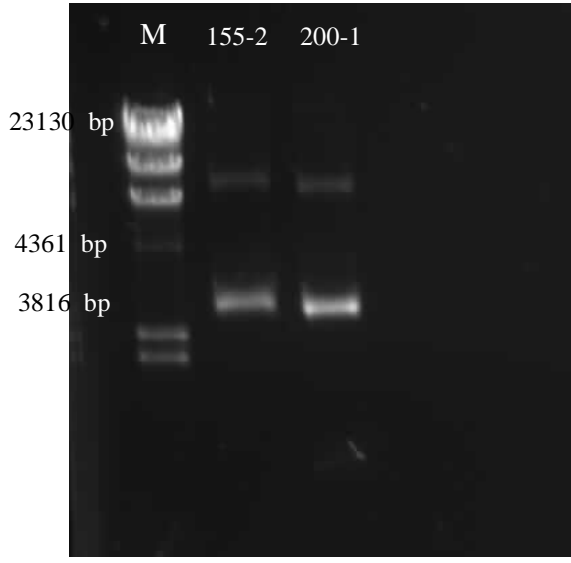
Plazmid bant büyüklüklerinin CTX-M için yaklaşık 3777 bp (2886 bp (vektör)+ 891 bp (klonlanmış gen ürünü)), SHV için 3816 bp (2886 bp (vektör)+ 930 bp (klonlanmış gen ürünü)), TEM için 3966 bp (2886 bp (vektör)+ 1080 bp (klonlanmış gen ürünü)) olması

beklenmektedir. Bant büyüklüğüne bakılarak klonlanan genlerden plazmid elde edilip edilmediği sonucuna varıldı (Şekil 17,18,19). Şekil 17’de uygun büyüklükteki bantın yanı sıra diğer bantların görülmesinin nedeni plazmidlerin lineer, sirküler ve süper heliks olmak üzere üç formda bulunabilmesidir. Jel üzerinde süper heliks DNA’lar daha ileride lokalizasyona sahip olmalarına rağmen diğerleri başlangıç noktasına yakın bulunurlar.



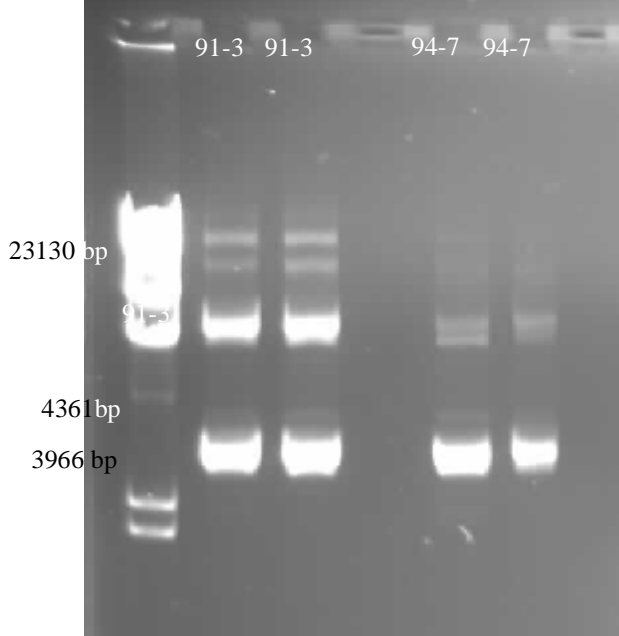
Şekil 17. plazmid DNA/CTX-M, M: marker (Fermentas SM0101, λ Hind III-2)

66-23 ve 94-10 CTX-M klonları için yaklaşık 3777 bp (2886 bp (vektör)+ 891 bp (klonlanmış gen ürünü)) büyüklüğünde olan bantlar seçilerek jelden ekstraksiyon yapıldı (Şekil 17).



Şekil 18. plazmid DNA/SHV, M: marker (Fermentas SM0101, λ Hind III-2)

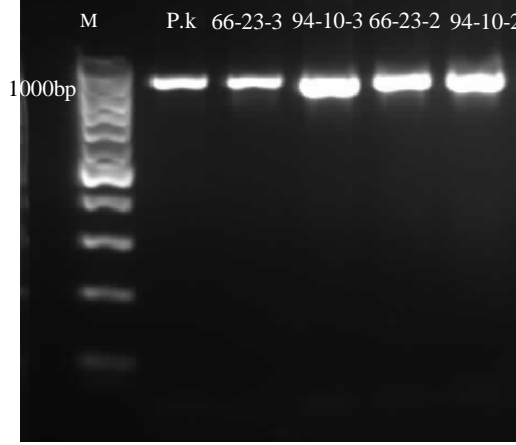
155-2 ve 200-1 SHV klonları için yaklaşık 3816 bp (2886 bp (vektör)+ 930 bp (klonlanmış gen ürünü)) büyüklüğünde bantlar seçilerek jelden ekstraksiyon yapıldı (Şekil 18).



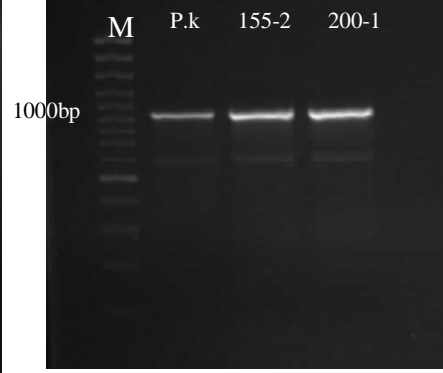
Şekil 19. plazmid DNA/TEM, M: marker (Fermentas SM0101, λ Hind III-2)

91-3 ve 94-7 TEM klonları için 3966 bp (2886 bp (vektör)+ 1080 bp (klonlanmış gen ürünü)) büyüklüğünde bantlar seçilerek jelden ekstraksiyon yapıldı (Şekil 19).

Plazmid DNA'sı agaroz jelden saflaştırma yapıldıktan sonra ekstraktlardan CTX-M-1, SHV, TEM PZR çalışıldı.

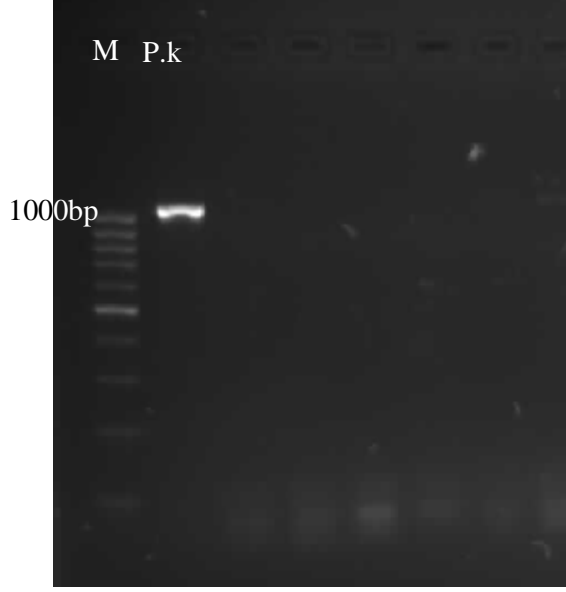


Şekil 20. CTX-M-1 PZR jel görüntüsü



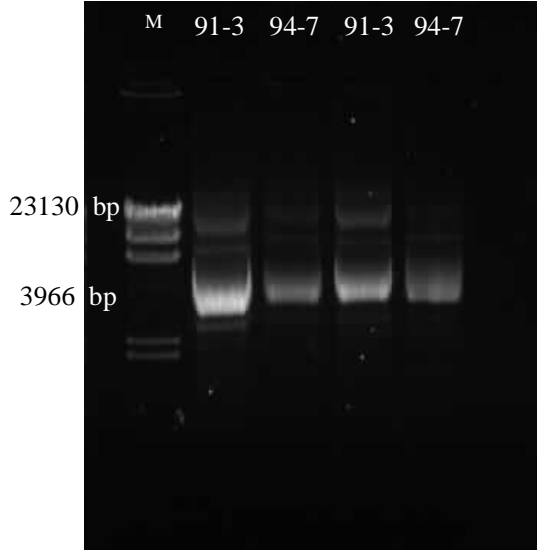
Şekil 21. SHV PZR jel görüntüsü

CTX-M-1 PZR sonucunda pozitif kontrol ile aynı hizada 891 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi (Şekil 20). SHV PZR sonucunda pozitif kontrol ile aynı hizada 930 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi (Şekil 21).

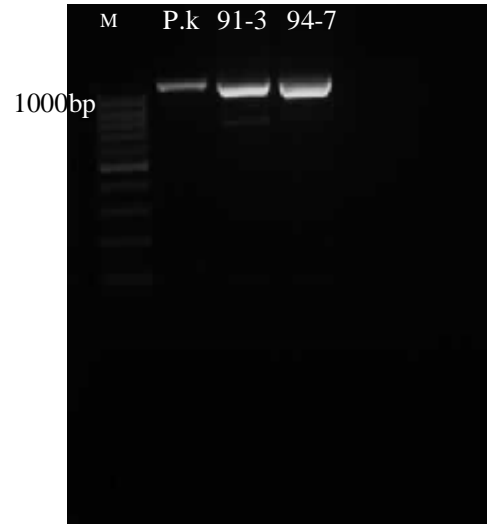


Şekil 22. TEM PCR jel görüntüsü

TEM PZR ile çalışılan 91-3 ve 94-7 numaralı klonlarda 1080 bp büyüklüğünde bant gözlenmediğinden bu klonların Terrific Broth kültürleri yapılarak işlemler tekrarlandı (Şekil 22).



Şekil 23. plazmid DNA/ TEM



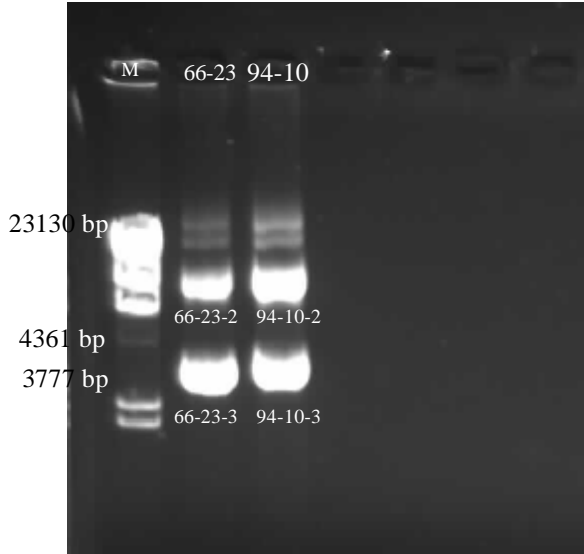
Şekil 24. TEM PZR jel görüntüsü

91-3 ve 94-7 TEM klonları için 3966 bp (2886 bp (vektör)+ 1080 bp (klonlanmış gen ürünü)) büyüklüğünde bantlar seçilerek jelden ekstraksiyon yapıldı (Şekil 23). Plazmid DNA'sı

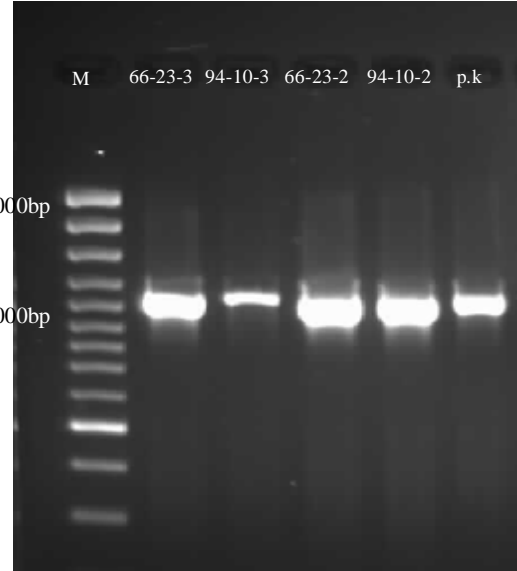
agaroz jelden saflaştırma yapıldıktan sonra ekstraktlardan TEM PZR yapıldı ve TEM PZR sonucunda pozitif kontrol ile aynı hizada 1080 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi (Şekil 24).

6.5. Klonlardan M13F-pUC-F, M13F-pUC-R Primerleri ile PZR

Plazmid DNA'sını elde ettiğimiz iki CTX-M klonunun jel ekstraktlarından M13 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Sonuçlar Şekil 25,26'da gösterilmektedir.



Şekil 25. plazmid DNA/ CTX-M



Şekil 26. M13 PZR jel görüntüsü

M13 primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda pozitif kontrol ile aynı hizada yaklaşık 1000 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi (Şekil 26).

6.6. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi sonuçları çeşitli referans dizgileriyle Clustal X ve Mega 3.1 programında karşılaştırılmıştır.

6.6.1. CTX-M Klonları

66-23, 94-10 numaralı CTX-M-1 klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R ve CTX-M-1A, CTX-M-1B primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Dizi analizi sonuçlarının CTX-M referans dizgileriyle Clustal X programında karşılaştırılması sonucu; 66-23 numaralı suşun CTX-M-3 ile 94-10 numaralı suşun CTX-M-15 ile % 100 oranında uyumlu olduğu belirlendi.

Şekil 27 ve 28'de 66-23 ve 94-10 numaralı suşlara ait DNA dizi analizi sonucu görülmektedir. Gelen dizi analizi sonucuna ait nükleotid dizileri üzerinde M13F-pUC-F/ R primerleri kırmızı, CTX-M-1A/ 1B primerleri mavi renkte görülmekte olup arada kalan altı çizili kısım CTX-M-3 veya CTX-M-15 ile % 100 uyumlu olduğu belirlenmiş bölgeyi göstermektedir. Şekil 29 ve 30'da dizi hizalama "alignment" sonuçları ve bu dizilerin yer aldığı filogenetik ağaç gösterilmektedir.

Tablo 7. CTX-M dizi analizi için kullanılan öncüller

66-23/ 94-10	Öncüller
CTX-1A-F	5'- CCCATGGTTAAAAAATCACTG -3'
CTX-1B- R	5'- CCGTTTCCGCTATTACAAAC -3'
M13F-pUC-F(-46)	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M13F-pUC-R(-46)	GAGCGGATAACAATTTACACAAGG

66-23

M M13F-pUC-F



GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA

ATTTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATTCCCATGGTTAAAAAA
TCACTGCGCCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTT
AGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACTTG
CCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAAC
ACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGAT
GTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTG
AAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGAC
CTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGACGATGTC
ACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGA
TGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTC
GCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGAC

GTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATAACCACTTCACCTCGGG
CAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGAC
AGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGC
AGCGAGCATTGAGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAA
CCGGCAGCGGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCA
AAAGATCGTGCGCCGCTGATCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACC
TAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCA
CCGACGTTTGTAAATAGCGAAACGGAATCGGATCCCGGGCCCGTCTGACT
GCAGAGCCTGCATGCAAGCTTCCCTATAGTGAGTCGTATAGAGCTGGCG
CCTTGTGAAATTGTTATCCGCTC

M13F-pUC-R

Şekil 27. 66-23 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri kırmızı, CTX-M-1A/ 1B primerleri mavi renkte görülmektedir. Altı çizili kısım CTX-M-3 dizisine karşılık gelmektedir.

94-10

M13F-pUC-F

GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA

TACCTCGGAATGCATCTAGATTCCCATGGTTAAAAATCACTGCGCCAG
TTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCC
GCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGC
GGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAAT
TCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAG
TAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAAGCGAACCGA
ATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTAT
AATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCT
TAGCGCGCCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGA
TTGCTACGTTGGCGCCCGGTAGCGTCACCGCGTTCGCCGACAGCTG
GGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGC
CATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACTCGGGCAATGGCGCAA
CTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCG
CAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCA
GGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTG
GCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCG
CCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAAG
CCGTGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGTTTGT
AATAGCGAAACGGAATCGGATCCCGGGCCCGTCTGACTGCAGAGGCCTGC
ATGCAAGCTTTCCC

CCTTGTGAAATTGTTATCCGCTC

M13F-pUC-R

Şekil 28. 94-10 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri kırmızı, CTX-M-1A/ 1B primerleri mavi renkte gösterilmektedir. Altı çizili kısım CTX-M-15 dizisine karşılık gelmektedir.

66-23-94-10 alignment

```

#gi X92506.1|CTX-M-1          MVKKSRLRQFT LMATATVTLT LGSVPLYAQT ADVQQKLAEL ERQSGGRLGV ALI NTADNSQ
#gi Y10278.1|CTX-M-3          .....
#gi AY044436|CTX-M-15        .....
#gi DEU-66-23                .....
#gi DEU-94-10                .....
#gi X92507.1|CTX-M-2          .MTQ.I.RSM.TVM.LP..FS.AT.H.A.NS..Q.EA..KS.....
#gi AF189721.1|CTX-M-8        .MRHRVKRMM.T.CIS...A...A.N...A..KS.....D...A.
#gi 16357504_6336-7211|CTX-M-9 .T.RVQRMM.FA.A.CIP...A...SA...A..KS.....D...T.
#gi AF518567|CTX-M-25        .MR..V.RAM..T..C.S..A...C.A.N...A..KS.....T.

#gi X92506.1|CTX-M-1          ILYRADERFA MCSTSKVMAV AAVLKKSESE PNLLNQRVEI KKSGLVNYNP IAEKHVDGTM
#gi Y10278.1|CTX-M-3          .....
#gi AY044436|CTX-M-15        .....
#gi DEU-66-23                .....
#gi DEU-94-10                .....
#gi X92507.1|CTX-M-2          .....
#gi AF189721.1|CTX-M-8        T.....A...Q..D.KH.....
#gi 16357504_6336-7211|CTX-M-9 V...G...P.....A...Q..TQ.KK.V.S.K...S...I...T...N...
#gi AF518567|CTX-M-25        T.....Q..TQ.KG..S...P...I...N...

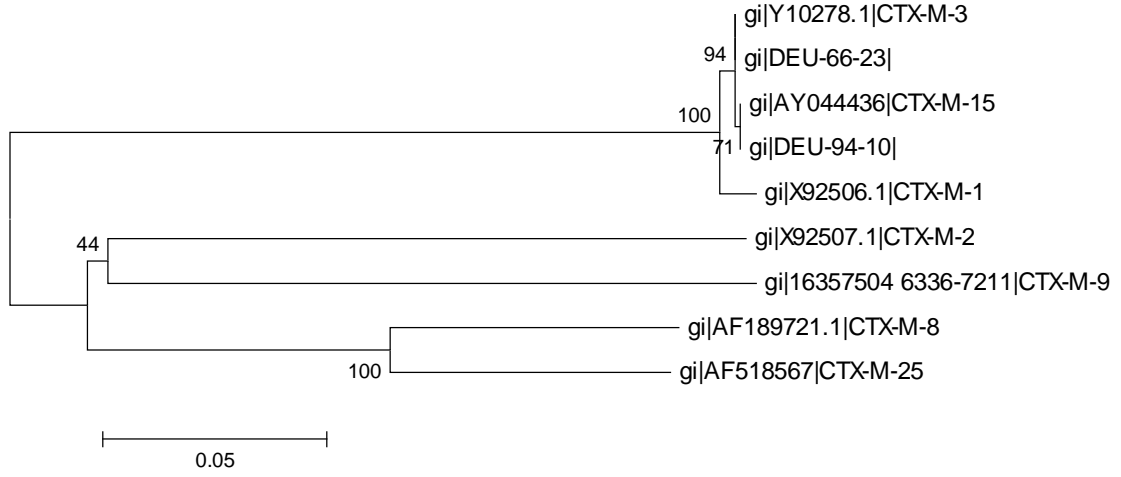
#gi X92506.1|CTX-M-1          SLAELSAAL QYSDNVAMNK LISHVGGPAS VTAFARQLGD ETFRLDRTEP TLNTAIPGDP
#gi Y10278.1|CTX-M-3          .....
#gi AY044436|CTX-M-15        .....
#gi DEU-66-23                .....
#gi DEU-94-10                .....
#gi X92507.1|CTX-M-2          T...G...T...A.L..DK...S...
#gi AF189721.1|CTX-M-8        T.....T...A.L..DK...AI..N...
#gi 16357504_6336-7211|CTX-M-9 T.....T...AQL..GG...AI..
#gi AF518567|CTX-M-25        TFG.....T...A.L..DK...TI..D...

#gi X92506.1|CTX-M-1          RDTTSPRAMA QTLRNLTGK ALGDSQRAQL VTWMKGNTTG AASI QAGLPA SWVVGDKTGS
#gi Y10278.1|CTX-M-3          .....
#gi AY044436|CTX-M-15        .....
#gi DEU-66-23                .....
#gi DEU-94-10                .....
#gi X92507.1|CTX-M-2          ...T.L...K...AET...L...S...R...K...
#gi AF189721.1|CTX-M-8        ...T.L...S..ET...L...T...
#gi 16357504_6336-7211|CTX-M-9 ...T...Q..H..ET...L...R...T..TA...
#gi AF518567|CTX-M-25        ...T.L...A...N..T...M.L...T...

#gi X92506.1|CTX-M-1          GDYGTNDIA VIWPKDRAPL I LVTYFTQPQ PKAESRRDVL ASA AKI VTNG L*
#gi Y10278.1|CTX-M-3          .....
#gi AY044436|CTX-M-15        .G.....
#gi DEU-66-23                .....
#gi DEU-94-10                .G.....
#gi X92507.1|CTX-M-2          .....
#gi AF189721.1|CTX-M-8        .....
#gi 16357504_6336-7211|CTX-M-9 .....
#gi AF518567|CTX-M-25        .G.....

```

Şekil 29. *E. coli bla_{CTX-M}* gen bölgesi için iki çalışma suşu ve yedi GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin CTX-M-1 dizisine göre hizalanmış şekli



Şekil 30. *E. coli* klonlarından izole edilen CTX-M beta-laktamaz enzimine ait 876 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç.

6.6.2. SHV Klonları

155-2, 200-1 numaralı SHV klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R, SHV-S(LE)-F, SHV-S2(LA)-R, SHV-F, SHV-R primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Dizi analizi sonuçlarının SHV referans dizileriyle Clustal X programında karşılaştırılması sonucu; 155-2 numaralı suşun SHV-5 ile 200-1 numaralı suşun SHV-12 ile % 100 oranında uyumlu olduğu belirlendi.

Şekil 31 ve 32'de 155-2 ve 200-1 numaralı suşlara ait DNA dizi analizi sonucu görülmektedir. Gelen dizi analizi sonucuna ait nükleotid dizileri üzerinde M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, SHV-S(LE)/ S2(LA) primerleri kırmızı, SHV-F/ R yeşil renkte görülmekte olup arada kalan altı çizgili kısım SHV-5/ SHV-12 ile % 100 uyumlu olduğu belirlenmiş bölgeyi göstermektedir. Şekil 33 ve 34'de dizi hizalama "alignment" sonuçları ve bu dizilerin yer aldığı filogenetik ağaç gösterilmektedir.

Tablo 8. SHV dizi analizi için kullanılan öncüller

155-2/ 200-1	Öncüller
M13F-pUC-F(-46)	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M13F-pUC-R(-46)	GAGCGGATAACAATTCACACAAGG
SHV-S(LE)-F	5'CAG ATC GGC GAC AAC GTC AC 3'
SHV-S2(LA)-R	5'GTG ACG TTG TCG CCG ATC TG 3'
SHV-F	5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-3'
SHV-R	5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'

155-2

M13F-pUC-F

GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA

AACGCCGGGT TATTCTTATT TGTCGCTTCT TTA CTGCCT TTATCGGCCT TCACTCAAGG
ATGTATTGTG GTTATGCGTT ATATTGCCT GTGTATTATC TCCCTGTTAG CCACCCCTGCC
GCTGGCGGTA CACGCCAGCC CGCAGCCGCT TGAGCAAATT AACTAAGCG AAAGCCAGCT
GTCGGGCCGC GTAGGCATGA TAGAAATGGA TCTGGCCAGC GGCCGCACGC TGACCCGCTG
GCGCGCGGAT GAACGCTTTC CCATGATGAG CACCTTTAAA GTAGTGCTCT GCGGCGCAGT
GCTGGCGCGG GTGGATGCCG GTGACGAACA GCTGGAGCGA AAGATCCACT ATCGCCAGCA
GGATCTGGTG GACTACTCGC CGGTACGCGA AAAACACCTT GCCGACGGCA TGACGGTTCGG
CGAACTCTGC GCCGCCGCCA TTACCATGAG CGATAACAGC GCCGCCAATC TACTACTGGC
CACCGTCGGC GGCCCCGAG GATTGACTGC CTTTTTGCGC CAGATCGGCG ACAACGTCAC
CCGCTTGAC CGCTGGGAAA CGGAACTGAA TGAGGCCTT CCCGGCGACG CCCGCGACAC
CACTACCCCG GCCAGCATGG CCGCGACCCT GCGCAAGCTG CTGACCAGCC AGCGTCTGAG
CGCCCGTTCG CAACGGCAGC TGCTGCAGTG GATGGTGGAC GATCGGGTCG CCGGACCGTT
GATCCGCTCC GTGCTGCCGG CCGGCTGGTT TATCGCCGAT AAGACCGGAG CTAGCAAACG
GGTGCGCGC GGGATTGTCG CCCTGCTTGG CCCGAATAAC AAAGCAGAGC GCATTGTGGT
GATTTATCTG CGGGATACGC CGGCGAGCAT GGCCGAGCGA AATCAGCAA TCGCCGGGAT
CGGCGCGGCG CTGATCGAGC ACTGGCAACG CTAA GCCGGC GGTGGCCGCG CGGCTTATCC
GGCCCGCAGC ACCTCGCAGG CGTGCCGGC GATATGACTG GCGGCGGCAT CGGAAAGA
CCTTGTA AATTGTTATCCGCTC

M13F-pUC-R

Şekil 31. 155-2 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, SHV-S(LE)/ S2(LA) primerleri kırmızı, SHV-F/ R yeşil renkte gösterilmektedir. Altı çizili kısım SHV-5 dizisine karşılık gelmektedir.

200-1

GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA

GGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGTGCCAACGCCGGGTTATCTTATTGTCGCTT
CTTTACTCGCCTTTATCGGCCTTCACTCAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTA
TCTCCCTGTTAGCCACCTGCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGTAGCAAATTAACAAG
CGAAAGCCAGCTGTGCGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGCCGACGCTGACCGCC
TGGCGGCCGATGAACGCTTTCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGC
GGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACT
GCCGGTCAGCGAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTTCGGCGAACTCTGCGCCGCCGATTACCATG
AGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGCCCCGAGGATTGACTGCCTTTTTGC
GCAGATCGGCGACAACGTCACCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGA
CGCCCGCAGACCACTACCCCGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTG
AGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGACCGTTGATCCGCT
CCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGATTGT
CGCCCTGCTTGGCCCCGAATAACAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACGCCGGCAGC
ATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAAGCCG
GCGGTGGCCGCGCGCTTATCCGGCCCGCAGCACCTCGCAGGCGTGCCGGGCGATATGACTGGCGGCGG

CCTTGTA AATTGTTATCCGCTC

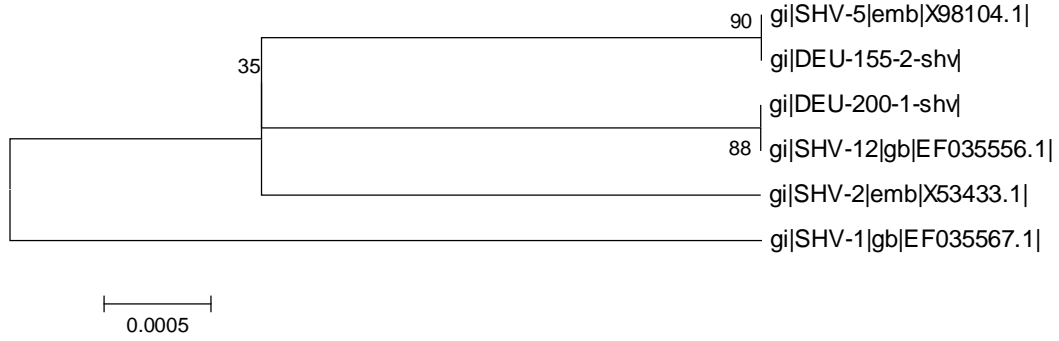
M13F-pUC-R

Şekil 32. 200-1 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, SHV-S(LE)/ S2(LA) primerleri kırmızı, SHV-F/ R yeşil renkte gösterilmektedir. Altı çizili kısım SHV-12 dizisine karşılık gelmektedir.

155-2-200-1 alignment

#gi	SHV-1 gb EF035567.1	MRYI	RLCI	I	S	LLATLPLAVH	ASPQPLEQI	K	LSESQLSGRV	GMI	EMDLASG	RTLTAWRADE
#gi	SHV-5 emb X98104.1
#gi	DEU-200-1-shv
#gi	SHV-12 gb EF035556.1
#gi	DEU-155-2-shv
#gi	SHV-2 emb X53433.1
#gi	SHV-1 gb EF035567.1	RFPMMSTFKV	VLCGAVLARV	DAGDEQLERK	IHYRQQDLVD	YSPVSEKHLA	DGMTVGELCA					
#gi	SHV-5 emb X98104.1
#gi	DEU-200-1-shv
#gi	SHV-12 gb EF035556.1
#gi	DEU-155-2-shv
#gi	SHV-2 emb X53433.1
#gi	SHV-1 gb EF035567.1	AAITMSDNSA	ANLLLATVGG	PAGLTAFLRQ	IGDNVTRLDR	WETELNEALP	GDARDTTTPA					
#gi	SHV-5 emb X98104.1
#gi	DEU-200-1-shv
#gi	SHV-12 gb EF035556.1
#gi	DEU-155-2-shv
#gi	SHV-2 emb X53433.1
#gi	SHV-1 gb EF035567.1	SMAATLRKLL	TSQRLSARSQ	RQLLQWMVDD	RVAGPLI	RSV	LPAGWFI	ADK	TGAGERGARG			
#gi	SHV-5 emb X98104.1	SK.....
#gi	DEU-200-1-shv	SK.....
#gi	SHV-12 gb EF035556.1	SK.....
#gi	DEU-155-2-shv	SK.....
#gi	SHV-2 emb X53433.1	S.....
#gi	SHV-1 gb EF035567.1	I	VALLGPNNK	AERI	VVI	YLR	DTPASMAERN	QQI	AGI	GAAL	I	EHWQR*
#gi	SHV-5 emb X98104.1
#gi	DEU-200-1-shv
#gi	SHV-12 gb EF035556.1
#gi	DEU-155-2-shv
#gi	SHV-2 emb X53433.1

Şekil 33. *K. pneumoniae*, *E. coli* bla_{SHV} gen bölgesi için iki çalışma suşu ve dört GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin SHV-1 dizisine göre hizalanmış şekli



Şekil 34. *K. pneumoniae* klonlarından izole edilen SHV beta-laktamaz enzimine ait 861 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç.

6.6.3. TEM Klonları

91-3, 94-7 numaralı TEM klonlarının plazmid ekstraktlarına, M13F-pUC-F, M13F-pUC-R, TEM-S1-F, TEM-S2-R, TEM-F, TEM-R primerleri ile çift yönlü olarak dizi analizi uygulandı. Dizi analizi sonuçlarının TEM referans dizileriyle Clustal X programında karşılaştırılması sonucu; TEM-1 ile % 100 oranında uyumlu olduğu ve aktif bölgede herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi.

Şekil 35 ve 36'da 91-3 ve 94-7 numaralı suşlara ait DNA dizi analizi sonucu görülmektedir. Gelen dizi analizi sonucuna ait nükleotid dizileri üzerinde M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, TEM-S(F)/ S2(R) primerleri kırmızı, TEM-F/ R yeşil renkte görülmekte olup arada kalan altı çizgili kısım TEM-1 ile % 100 uyumlu olduğu belirlenmiş bölgeyi göstermektedir. Şekil 37 ve 38'de dizi hizalama "alignment" sonuçları ve bu dizilerin yer aldığı filogenetik ağaç gösterilmektedir.

Tablo 9. TEM dizi analizi için kullanılan öncüller

91-3/94-7	Öncüller
M13F-pUC-F(-46)	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M13F-pUC-R(-46)	GAGCGGATAACAATTCACACAAGG
TEM-S-F	5' TAC ACT ATT CTC AGA ATG ACT 3'
TEM-S2-R	5' TTC TGT GAC TGG TGA GTA CT 3'
TEM-F	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3'
TEM-R	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'

91-3

M13F-pUC-F

GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
GGATCCTAGA ACGCACGAAT GAGGGCCGAC AGGAAGCAAA GCTGAAAGGA ATCAAATTTG
GCCGCAGGCG TACCGTGGAC AGGAACGTCG TGCTGACGCT TCATCAGAAG GGCCTGGTG
CAACGGAAAT TGCTCATCAG CTCAGTATTG CCCGCTCCAC **GGTTTATAAA ATTCTTGAAG**
ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC
TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT
CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GATAACAATA CCCTGGTAAA TGCTTCAATA
ATATTGAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTTCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT
TGCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAAGATGC
TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA CCGGTAAGAT
CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT
ATGTGGTGCG GTATTATCCC GTGTTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC **GCCGCATACA**
CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG
CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCTGCCAA
CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTTCG ACAACATGGG
GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA
CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGCAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG
CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT
TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG
AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC
CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA
GATCGCTGAG ATAGGTGCCT **CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC** AAGTTTACTC
ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT
CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC
AGACCCCGAA AACGATTTAG GAGACACCGA TGAACATCAA CGATGCCCTC ACCTCCATCC
CCTTGTGAAATTGTTATCCGCTC

M13F-pUC-R

Şekil 35. 91-3 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, TEM-S(F)/ S2(R) primerleri kırmızı, TEM-F/ R yeşil renkte gösterilmektedir. Altı çizgili kısım TEM-1 dizisine karşılık gelmektedir.

94-7

M13F-pUC-F

GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA

CAAAGCTGAAAGGAATCAAATTTGGCCGCAGGCGTACCGTGGACAGGAACGTCGTGCTGA
CGCTTCATCAGAAGGGCACTGGTGCAACGGAAATTGCTCATCAGCTCAGTATTGCCCGCT
CCACGGTTTATAAAATTCCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGT
TAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG
CGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGATACA
ATAACCCCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGAGTATTCAACATTT
TCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTCCTCACCAGA
AACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTGCACGAGTGGGTTACATCGA
ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAAT
GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCA
AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
CATGAGTGATAAACAATGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCT
AACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
GCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAAC
AACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC GGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGG
CTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGC
ACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGC
AACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTG
GTAACCTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTA
ATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACG
TGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGAAAACGATTTAGGAGACACCGATGAACA
CCTTGTGAAATTGTTATCCGCTC

M13F-pUC-R

Şekil 36. 94-7 numaralı suşa ait DNA dizi analizi sonucu gelen nükleotid dizisi. M13F-pUC-F/ R primerleri mavi, TEM-S(F)/ S2(R) primerleri kırmızı, TEM-F/ R yeşil renkte gösterilmektedir. Altı çizgili kısım TEM-1 dizisine karşılık gelmektedir.

91-3-94-7 alignment

```

#gi|TEM-1|gb|EF035622.1|MSIQHFRVAL I PFFAAFCLP VFAHPETLVK VKDAEDQLGA RVGYI ELDLN SGKI LESFRP
#gi|TEM-2|emb|AJ251946.1|.....K.....
#gi|DEU-91-3|.....
#gi|DEU-94-7|.....

#gi|TEM-1|gb|EF035622.1|EERFPMMSTF KVLCCGAVLS RVDAGQEQLG RRI HYSQNDL VEYSPVTEKH LTDGMTVREL
#gi|TEM-2|emb|AJ251946.1|.....
#gi|DEU-91-3|.....
#gi|DEU-94-7|.....

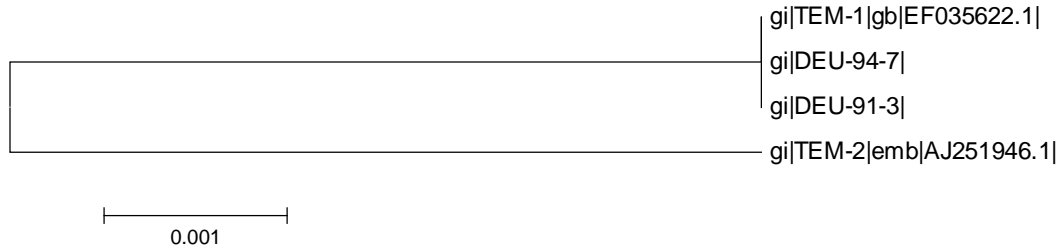
#gi|TEM-1|gb|EF035622.1|CSAAI TMSDN TAANLLTTI GGPKELTAFL HNMGDHVTRL DRWEPENEA I PNDERDTTM
#gi|TEM-2|emb|AJ251946.1|.....
#gi|DEU-91-3|.....
#gi|DEU-94-7|.....

#gi|TEM-1|gb|EF035622.1|PAAMATTLRK LLTGELLTLA SRQQLI DWME ADKVAGPLLR SALPAGWFI A DKSGAGERGS
#gi|TEM-2|emb|AJ251946.1|.....
#gi|DEU-91-3|.....
#gi|DEU-94-7|.....

#gi|TEM-1|gb|EF035622.1|RGI I AALGPD GKPSRI VVI Y TTGSQATMDE RNRQI AEI GA SLI KHW*
#gi|TEM-2|emb|AJ251946.1|.....
#gi|DEU-91-3|.....
#gi|DEU-94-7|.....

```

Şekil 37. *E. coli* *bla*_{TEM} gen bölgesi için iki çalışma suşu ve iki GenBank dizisinin aminoasit dizilerinin TEM-1 dizisine göre hizalanmış şekli



Şekil 38. *E. coli* klonlarından izole edilen TEM beta-laktamaz enzimine ait 861 nükleotidlik dizilerin Neighbour Joining yöntemi ve Kimura-2 parametre düzeltmesiyle uygulanarak elde edilen filogenetik ağaç.

Özet olarak klonlama deneylerinin sonucunda CTX-M klonlarında CTX-M-3 ve CTX-M-15, SHV klonlarında SHV-5 ve SHV-12 ve TEM klonlarında ise TEM-1 bulundu (Tablo 10). Sonuçlarımıza göre GSBL üreten TEM klonlarının seçiminde başarısız olduğu düşünüldü.

Tablo 10. Dizi analizi sonuçlarına göre GSBL tipleri

Suş No	CTX-M
66-23 (<i>E. coli</i>)	CTX-M-3
94-10 (<i>E. coli</i>)	CTX-M-15
	SHV
155-2 (<i>K. pneumoniae</i>)	SHV-5
200-1 (<i>K. pneumoniae</i>)	SHV-12
	TEM
91-3 (<i>E. coli</i>)	TEM-1
94-7 (<i>E. coli</i>)	TEM-1

7. TARTIŞMA

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, geniş spektrumlu penisilinleri, monobaktamları ve sefamisinler hariç sefalosporinleri hidroliz edebilen enzimlerdir (8). GSBL'ler, gram negatif bakterilerde bulunan temel beta-laktamazların yapısal genlerindeki mutasyonlar ile ortaya çıkmıştır (7). *Klebsiella* spp. ve *E.coli*'lerde daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. de dahil, bir çok enterik bakteride bildirilmiştir (38,101,102).

GSBL taşıyan bakterilerin sıklığı genellikle yoğun bakım servislerinde kullanılan geniş spektrumlu penisilin veya sefalosporinlerin kullanımı ile doğru orantılıdır. GSBL üreten suşlarla oluşan salgınlar, daha çok hastanede uzun süre kalanlarda, operasyon geçirenlerde, arteriyel ve üriner kateteri olanlarda ve özellikle yoğun bakım servislerindeki hastalarda oluşmaktadır (8). Özellikle hastane kaynaklı infeksiyonlarda sık olarak bulunan bu enzimlerin yaygınlığı ve hızla yayılımı önemli bir tedavi sorunu oluşturmaktadır. Genel olarak ülkemizde hastane infeksiyonu etkeni *E.coli* ve *Klebsiella*'larda GSBL pozitiflik oranı % 30 dolayındadır fakat bu oran bazı hastane yoğun bakım servislerinde % 50-60'lara çıkmaktadır (103,104).

GSBL üreten etkenlerin prevalansı ülkemizde de dahil olmak üzere tüm dünyada artış göstermektedir (5). GSBL oluşturan izolatların oranı, ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanesinde çeşitli birimler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık lokal epidemiyolojik faktörlere, genel infeksiyon kontrol önlemlerine ve antibiyotik kullanım politikalarına bağlanmaktadır.

Hastanemizde 05.2002-04.2004 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların incelendiği bir çalışmada, *E. coli* suşlarında ilk yıl GSBL oranı % 12 iken ikinci yıl % 23'e ulaştığı saptanmıştır (23). Aynı tarihler arasında hastane kökenli idrar yolu enfeksiyonu etkeni *E. coli*'lerde GSBL oranının % 17 artış gösterdiği belirlenmiştir (105).

Son yıllarda, TEM ve SHV türevlerine ek olarak CTX-M grubu enzimlerin tüm dünyada bu arada ülkemizde de yayıldığı görülmektedir. 2002-2003 yıllarında yedi farklı merkezde toplanmış GSBL üreten izolatlarla yapılan çalışmada, CTX-M tipi enzim sıklığının *E. coli* izolatlarında % 76, *K. pneumoniae* izolatlarında % 83, *Enterobacter* izolatlarında ise % 50 olduğu gözlenmiştir (10). Aktaş ve ark. (106) ise *E.coli* izolatlarının % 100'ünde, *K.pneumoniae* izolatlarının ise % 47'sinde CTX-M tipi enzim varlığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada *E.coli*'lerdeki en yaygın enzim tipinin CTX-M, *K.pneumoniae*'de ise SHV türevleri

olduğu gösterilmiştir. Ülkemizde şimdiye kadar CTX-M-2, CTXM-3 ve CTX-M-15 enzim tipleri saptanmıştır (10,12,38,41).

2005 yılında ise Gür ve arkadaşlarının yaptığı Hitit çalışmasında merkezimizde % 79 oranında *bla_{CTX-M}* pozitifliği saptanmıştır. Çalışmada incelenen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bu oran % 60, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'nde % 57, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde % 70, Marmara Tıp Fakültesi 'nde % 75 ve İbni Sina Hastanesi'nde ise % 72 olarak belirlenmiştir (37).

Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL varlığını göstermek ve doğrulamak için çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır (77). CLSI önerilerine göre, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli* için disk difüzyon yöntemiyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır (78). Doğrulama amacıyla klavulanik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı, çift disk sinerji yöntemi ve E-test gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır (79,80).

Birçok laboratuvarda rutin olarak GSBL taraması yapılmamakta ve rutin yöntemler ile GSBL pozitif suşlar her zaman yakalanamamaktadır. Fenotipik testler yalnızca GSBL varlığını göstermektedir (5). İzoelektrik odaklama beta-laktamaz tanımlanması için geleneksel olmasına rağmen bu yaklaşım benzer izoelektrik odak noktasına sahip olan GSBL'ler arasında ayrımı güçleştirmektedir (5). İzoelektrik odaklama yöntemi proteinlerin izoelektrik noktasını belirlemek için kullanılmaktadır (82). Birçok beta-laktamaz benzer izoelektrik noktalarına sahiptir ve bu yüzden günümüzde izoelektrik odaklama yöntemi ile ayırım mümkün değildir (15).

Çift disk sinerji testiyle GSBL paterni görülmesi ve izoelektrik odaklama gibi fenotipik yöntemler tek başlarına beta-laktamaz tipinin belirlenmesinde yeterli değildir.

Beta-laktamaz genlerinin belirlenmesinde moleküler biyolojik yöntemler önerilmektedir. Bu amaçla, oligotiplendirme, PZR-SSCP, PZR-REA ve klonlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (15). Beta-laktamazların tanımlanmasında ilk moleküler yöntem olan oligotiplendirme TEM-1 ve TEM-2 arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır. Bu yöntemde nokta mutasyonlarını belirlemek için tasarlanan oligonükleotid problemler kullanılmıştır. *bla_{TEM}* genindeki altı pozisyonda gerçekleşen mutasyonu belirleyen ek oligonükleotid problemler geliştirilerek bir takım klinik izolatlarda birkaç yeni TEM varyantı belirlenmiştir (5).

PZR-SSCP yöntemi, yüksek ayrımlı denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutasyon içeren ve doğal tip tek sarmallı DNA'nın farklı hareketlilik göstermesi temeline dayanmaktadır (86,87).

Bu yöntem *bla_{SHV}* genindeki spesifik lokasyonlarda tek baz mutasyonunu belirlemek için kullanılmıştır (5). PZR-REA, PZR sonrası elde edilen DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilmesine dayanır (80,88). Yöntemin dezavantajları genomda ortaya çıkan doğal mutasyonların kesim bölgelerini değiştirebilmesi ve bazen kısmi kesimlerin olmasıdır (88).

PZR, bir çeşit in vitro klonlamadır. Spesifik hedef DNA dizilerinin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. PZR yöntemi bazı GSBL'lerin tiplendirilmesinde tek başına kullanılmasına rağmen genellikle başka yöntemlerle beraber uygulanmalıdır. PZR tabanlı testlerin avantajı daha hızlı olmasıdır (69,85).

Birçok çalışmada beta-laktamazların tanımlanmasında tek basamaklı PZR ve ardından dizi analizi uygulaması yapılmıştır. 2005 yılında Cezayir'de bir hastanede yapılan çalışmada 16 GSBL pozitif *E. coli* suşunun ürettiği beta-laktamazların tanımlanmasında PZR ve dizi analizi yapılmıştır. Suşların TEM'le birlikte ya CTX-M-3 (n=3) ya da CTX-M-15 (n=13) tipi beta-laktamaz taşıdığı saptanmıştır (107). Yunanistanda yapılan araştırmada ise SHV-5 en baskın GSBL tipi olarak gözlenmiştir (108). İngiltere York Hastanesinde yapılan araştırmada toplanan GSBL üreten 22 *Enterobacteriaceae* izolatının ürettiği TEM, SHV ve CTX-M genleri PZR ve dizi analizi ile belirlenmiştir (109).

Son yıllarda genellikle GSBL tiplendirilmesinde PZR ve dizi analizi gibi moleküler yöntemler kullanılmasına rağmen tek basamaklı PZR ve ardından dizi analizi uygulaması aynı aileden birden fazla GSBL üretildiğinde yanlış veya yetersiz sonuç vermektedir. Bu nedenle de öncelikle bakterilerin ürettiği GSBL'lerin ayrılması gerekmektedir.

Bir izolat için klonlama yöntemi en az 3 gün, PZR ortalama 4-5 saat ve dizi analizi ise yaklaşık 2 hafta sürmektedir. Klonlama ve ardından dizi analizi yapılarak bir izolat başına sonucun alınması ortalama 70YTL, PZR ve ardından dizi analizi yapılarak sonucun alınması ortalama 35YTL olmaktadır. Daha uzun süreli ve daha yüksek maliyetli olmasına rağmen klonlama yöntemi, hedef genin pek çok özdeş kopyasının üretilmesini sağlamaktadır yani bir suşa ait çok sayıda klon elde edilmektedir. Aynı organizmada SHV veya TEM tipi beta-laktamazların farklı varyantları bir arada bulunabilmektedir. *E. coli*'deki TEM-1 veya *K. pneumoniae*'daki SHV-1 gibi hem geniş spektrumlu beta-laktamaz ile hem de genişlemiş spektrumlu bir başka beta-laktamazın da bir arada olduğu durumlar olabilmektedir. Bu durumda, GSBL'yi saptayabilmek için klonlama, ardından dizi analizi yapmak

gerekmektedir. Ayrıca klonlama sonrası söz konusu gen ürünleri izole edilebilir ve araştırmalarda kullanılabilir. Günümüz şartlarında ancak rutin dışı uygulamalarda beta laktamaz genleri klonlanmakta, ardından dizi analizi uygulanmaktadır.

Soge ve ark. (110), yaptıkları bir çalışmada CTX-M-1 PZR sonucu pozitif çıkan 2 *K. pneumoniae* izolatının CTX-M beta-laktamaz genini pCR-T7/NT-TOPO vektörüne klonlamışlardır. T7 ileri ve geri primerleri ile dizi analizi uygulanmıştır. İki *K. pneumoniae* izolatında CTX-M-15 tipi beta-laktamaz saptanmıştır. Paterson ve ark. (12), aralarında Türkiye'nin de olduğu 7 ülkeden toplanan ve GSBL üreten *K. pneumoniae*. izolatlarının ierfdikleri beta-laktamaz tiplerini araştırmışlardır. Beta-laktamaz genleri, pCR 2.1-TOPO vektörüne klonlanmıştır. Cy5-işaretli M13 geri ve M13 ileri primerleri ile dizi analizi uygulanmıştır. Türkiye'den toplanan dokuz izolat arasından bir izolatın TEM1B, SHV-5 ve CTX-M-2, üç izolatın TEM-2, SHV-1, PER; bir izolatın TEM-2, SHV-2, PER; 1 izolatın ise SHV-5 ve PER ürettiği belirlenmiştir.

Ülkemizde klonlama çalışmaları genellikle Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmamaktadır. Bu tez çalışması ile Anabilim Dalımızda ilk kez beta-laktamaz genleri klonlanmıştır. Kan kültürlerinde üretilmiş, fenotipik testler ve PZR ile farklı genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ürettiği belirlenmiş klinik *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarındaki *bla_{ctx-m}*, *bla_{tem}*, *bla_{shv}* genlerinin klonlanmasını hedeflediğimiz alışmamızda T/A klonlama yapan “InsTAclone™ PCR Cloning Kit” kullanılmıştır. T/A klonlama sisteminin diğer klonlama sistemlerine göre avantajları maliyetinin daha düşük ve daha kolay uygulanabilir olmasıdır. 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PZR ürünleri, komplementeri olan 3'-T uzantılı bir vektöre klonlanmaktadır. T vektör ve PZR ürünlerinin komplementer uçları DNA ligaz enzimi ile birleştirilerek rekombinant DNA molekülleri oluşturulmaktadır (94). Klonlama vektörü olarak plazmid pTZ57R kullanılmıştır. Sekanslanacak DNA fragmentleri vektörün *lacZ* geni içindeki oklu Klonlama Bölgesi içine girmektedir. pTZ57R/T plazmid vektör sistemi, bakterilerde ampisilin ve mavi/beyaz koloni seçiciliğine göre ayırım yapmaktadır (89). Mavi/ beyaz seçiciliğinde beyaz koloniler genellikle hedef DNA içeren plazmidleri gösterirken, mavi koloniler DNA ile birleşmeden ligasyona uğramış plazmidleri gösterirler. Mavi/ beyaz koloni taramasında *lac+* genotipini belirlemek için X-Gal ve IPTG birlikte kullanılmaktadır. Plazmid üzerinde *lacZ* geni bulunmaktadır. Hedef DNA, plazmid içine yerleştiğinde bu gen inaktive olmakta, X-gal ve IPTG eklenecek hazırlanmış besiyerinde hedef DNA içeren plazmidler beyaz koloniler oluştururken, ligasyon

basamağında hedef DNA'nın eklenemediği plazmidleri içeren bakteriler mavi koloniler oluşturmaktadır (91). Bu çalışma da, klonlama işlemleri sonucunda *lac Z* repressörü inaktive eden IPTG ve X-Gal kullanılarak klonlanan PZR ürünü içeren bakteri kolonileri beyaz koloni; içermeyenler ise mavi görünüşleri ile ayırt edilmiştir. Gen transferinin doğruluğunu anlamak amacıyla transforme bakteri kolonileri kullanılarak PZR ile klonlanan *bla* geni araştırılmış, klonlanmış genin nükleotid dizilerinin saptanması amacıyla dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçlarının çeşitli referans dizileriyle Clustal X programında, aminoasit dizilerinin ise Mega 3.1 programında karşılaştırılması sonucunda CTX-M klonlarında CTX-M-3 ve CTX-M-15, SHV klonlarında SHV-5 ve SHV-12 ve TEM klonlarında ise TEM-1 bulunmuştur. TEM-1 genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimi olmadığından sonuçlarımıza göre GSBL üreten TEM klonlarının seçiminde başarısız olduğu görülmüştür. Bu durumda ana suşun birden fazla TEM tipi beta-laktamaz ürettiği, bunların en az birinin TEM-1 diğerinin ise genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz olduğu PZR ürününün klonlanması ile seçilen klonların ise sadece *bla_{TEM-1}* içerdiği düşünülebilir.

Sonuç olarak beta-laktamaz genlerin tanımlanmasında, klonlama ve ardından dizi analizi yapılmaktadır. Klonlama, spesifik DNA bölgelerinin elde edilebilmesi, detaylı tanımlanabilmesi, genomik yapı ve fonksiyon çalışmaları için gereklidir. Ancak ucuz olmaması ve en az iki gün gecikmesi nedeniyle rutin olarak uygulanamamaktadır. Buna karşın genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tip tayinlerinin yapılmasında sıklıkla klonlama uygulamasına gerek duyulmaktadır. Biz de bu çalışmamızda, Anabilim Dalımızda ilk kez farklı genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar üreten klinik *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarındaki *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* genlerinin klonlanmasını gerçekleştirdik. **Bu çalışmada GSBL genlerinin Anabilim Dalımızda klonlanabilmesi, bunlar ve benzeri enzimlerle ilgili tanımlama çalışmalarının doğru olarak yapılmasına olanak sağlayacaktır.**

8. KAYNAKLAR

1. Ostroff SM, Leduc JW. Global epidemiology of infectious diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone Inc.; 2000. p.167-8
2. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora 1997; 3(Ek-1): 1-16
3. Medeiros AA. β -laktamazlar: kalite ve direnç. Clin. Microbiol Infect 1997; 3(14): 452-59
4. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. s. 91-112
5. Bradford PA. Extended-spectrum β -laktamazlar in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-951.
6. Livermore DM. β -laktamazlar in laboratory in clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 557-584
7. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-laktamazlar. Clin Infect Dis. 2006; 42: 153-63.
8. Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, Ramon Hernandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum b-laktamazlar. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 625–631
9. Akova M. GSBL'ler ve klinik önemli ve sorunlu gram negatif bakteri enfeksiyonları. S. 86-120
10. Gülay Z, Terek G, Eraç B *et al.* High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-laktamazlar in members of *Enterobacteriaceae* in Turkey. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Abstract Book: p752, May 1-4, 2004, Prague, Czech Republic.
11. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, Amyes SG. High prevalence of extended spectrum beta-laktamazlar production among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at a University Hospital in Turkey. J Chemother. 2000; 12(2): 145-52.

12. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B et al. International Klebsiella Study Group. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(11): 3554-60.
13. Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M et al. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(3):628-33.
14. Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y et al. CTX-M and SHV-12 beta-lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245(1): 93-8.
15. Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF, Wu TL. Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M beta-lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4486-91.
16. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5715–5721
17. Gülay Z. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *Toraks Dergisi*, 2002; 1: 75-88.
18. Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085-9.
19. [http:// www. lahey. org/webt. htm](http://www.lahey.org/webt.htm)
20. Pitout JD, Nordmann P, Lauplend KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 52-9
21. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RF, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28(2): 302–307
22. Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 1-16.

23. Ağca H, Doğan G, Atay T, Gülay Z. Kan kültürlerinden sık izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: 19-23 Eylül, Kuşadası, Aydın, Türkiye.
24. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 1074-1102.
25. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat 2006; 9(3): 142–156
26. Çolak D. Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. s. 81-85
27. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997; 785-856
28. Gür D. Gram-negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, leblecioğlu H, Arman D. Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004, 69-83.
29. Turner PJ. Extended spectrum β - lactamases. Clin Infect Dis 2005; 41: 273-5.
30. Partridge SR, Hall RM. Evolution of transposons containing blaTEM genes. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(3): 1267-8.
31. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(11): 2488-93.
32. Rosenau A, Cattier B, Gousset N, Harriau P, Philippon A, Quentin R. *Capnocytophaga ochracea*: characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 beta-lactamase in the phylum *Flavobacter-Bacteroides*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3): 760–762
33. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(10): 2856-61.

- 34.** Poirel L, Heritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(2): 755-8.
- 35.** Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2200-2223.
- 36.** Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234(2):201-7.
- 37.** Gür D. Hitit Projesi 2005.
- 38.** Açıkgöz ZC, Gülay Z, Bicmen M, Gocer S, Gamberzade S. CTX-M-3 Extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 503-505
- 39.** Aktaş Z. Gonullu N, Schneider I, Bal C, Bauernfeind A. Detection of CTX-M-15 type extended spectrum beta-lactamase in an *Escherichia coli* strain isolated from the urine sample of a hospitalized patient. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39(4): 421-9
- 40.** Ayhan Y, Gülay Z, Biçmen M, Gülfidan G, Meşe T, İnan S. Outbreak due to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium producing SHV-12 and CTX-M-3 extended spectrum beta lactamases (ESBLs) at a children's. 3rd Balkan Conference of Microbiology, September 4-6, 2003, İstanbul
- 41.** Lartigue MF, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. First description of CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(2): 315-6.
- 42.** Chen Y, Delmas J, Sirot J. Shoichet B, Bonnet R. Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol* 2005; 348(2): 349–362
- 43.** Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 104-114.
- 44.** Vahaboğlu H, Sarıbaş S, Akbal H, Ozturk R, Yucel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and / or OXA-10 type β -lactamase for producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(2): 269-270

45. Eraç B. Hastane kökenli Gram-negatif bakterilerde PER-1 enziminin moleküler epidemiyolojisi. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 2006.
46. Quinteros M, Radice M, Gardella N *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(9): 2864-7.
47. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-lactamases: the quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2): 306–325.
48. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K *et al.* PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(12): 2909-13.
49. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 2006; 12(4): 223-30.
50. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(7): 695-6.
51. Midilli K, Aygün G, Kuşkucu M, Yaşar H, Ergin S, Altaş K. Bir *Klebsiella pneumoniae* kökeninde saptanan yeni bir metallo-beta-laktamaz varyantı: VIM-5. XI. Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabında s.275, İstanbul, 2003.
52. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A *et al.* Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1): 282-3.
53. Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 614–622
54. Yamaguchi Y, Kuroki T, Yasuzawa H, Higashi T *et al.* Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and X-ray crystallography. *J Biol Chem.* 2005; 280(21): 20824-32.
55. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated

ampc b-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(3): 563–569

56. Widemann Bi Dietz H, Preifle D. Induction of beta-lactamase in *Enterobacter aerogenes*. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 42-7

57. Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar. In: Ulusoy S, İblecioğlu H, Arman D. Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları. 1th ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. 95-110.

58. Negri MC, Morosini MI, Blazquez J, Baquero F. Antibiotic resistance in hospital infections: the role of newer cephalosporins. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6: 95-7.

59. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 1-11.

60. Brown S, Amyes SG. OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1-3.

61. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S et al. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4885-8.

62. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(12): 3117-22.

63. Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6): 1362-6.

64. Brown S, Amyes SG. The sequences of seven class D b-lactamases isolated from carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 326–328

65. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G *et al.* High prevalence of OXA-51-type class D b-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 537–542.

- 66.** Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P: Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15
- 67.** Alaeddinoğlu G. Mikroorganizma genetiği. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. s. 71-79
- 68.** Madigan MT, Partinko JM, Parker J. Brock Biology of Microorganism. 9th ed. 2000; 290-337.
- 69.** Klug WS, Cummings MR. Genetik Kavramlar. Ankara: Palme yayıncılık; 6th ed. 2002; 177-597.
- 70.** Roberts AP, Mullany P. Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 36-46.
- 71.** McKane L, Kandel J. Microbiology essentials and applications. Second Edition. McGraw-Hill Inc, 1996; 208-211
- 72.** Llosa M, de la Cruz F. Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Res Microbiol*. 2005; 156(1): 1-6.
- 73.** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller M. Medical Microbiology. 4th ed. Mosby Publishing Company, 2002; 35-47.
- 74.** Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(11): 761-70.
- 75.** Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 272–288.
- 76.** Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 59-64
- 77.** Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE, Tenover FC. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 294-8.

- 78.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. M100-S15, Vol.25, No.1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2005.
- 79.** Laboratory detection and reporting of bacteria with extended spectrum β -lactamases Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory 2005; 1: 1- 15
- 80.** Shah AA, 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 2004; 155(6): 409-21
- 81.** Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. J Clin Microbiol. 2003; 41(8): 3933-5.
- 82.** Nelson DL, Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. Third edition. New York, Worth Publishers, 2000; 135-136
- 83.** Mendonca N, Ferreira E, Canica M. Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum beta-lactamase-producing evaluation. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56(4): 415–20
- 84.** Mabilat C, Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(11): 2210-6.
- 85.** Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth Edition. New York, Taylor&Francis Group, Garland publishing, 2002; 491-513, 508-509
- 86.** Alonso R, Fernandez-Aranguz A, Colom K, Cisterna R. Non-radioactive PCR-SSCP with a single PCR step for detection of inhibitor resistant beta-lactamases in *Escherichia coli*. J Microbiol Method 2002; 50(1): 85-90.
- 87.** Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Mol Ecol 2000; 9(11): 1699-1710

88. Eroğlu C. Tüberküloz tanısında PCR. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
89. <http://www.fermentas.com/catalog/kits/kitinstaclone.htm>
90. http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf
91. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning a laboratory Manual (volume 2). 3th ed. New York, Cold Spring Harbor, 2001; 8.30-8.41
92. Griffiths JF, Miller HJ, Suzuki DT, Lewantin RC. An introduction to genetic analysis. Seventh Edition. New York, W.H.Freeman&Company, 2002; 365-394
93. Alberts B, Bray D, Julian L, Martin R. Molecular biology of the cell. Second Edition. New York&London, Garland publishing, 1989; 258-274
94. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA cloning. Curr Issues Mol Biol 2000; 2(1): 1-7
95. Mead DA, Pey NK, Herrnstadt C, Marcil RA, Smith LM. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. Biotechnology (N Y). 1991; 9(7): 657-63.
96. Franca LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. Q Rev Biophys 2002; 35(2): 169-200.
97. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH *et al.* Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. J Appl Microbiol 2005; 98(4), 921–27
98. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients, J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1089–94
99. Kim J, Lim Y, Jeong YS, Seol Sy. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(4): 1572-1575
100. Englen MD, Kelley LC. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 2000, 31(6), 421-6
101. Gür D. Toplumdan kazanılmış infeksiyonlarda beta-laktamazların rolü. Ankem 2006; 20: 274-77

- 102.** Rahal JJ. Extended-spectrum beta-lactamases: how big is the problem. Clin Microbiol Infect 2000; 6(2): 2-6.
- 103.** Bal Ç. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli gram negatif çomak sorunu. Ankem Derg 2004; 18: 212-214
- 104.** Garcia-Rodriquez JA, Jones RN and the MYSTIC Programme Study Group. Antimicrobial resistance in Gram negative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, J Chemother 2002; 14: 25-32.
- 105.** Agca H, Dogan G, Atay T, Gülay Z. İdrar yolu enfeksiyonu etkenleri ve antibiyotik duyarlılıkların retrospektif olarak incelenmesi. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p403, 19-23 Eylül, 2004, Kuşadası, Aydın, Türkiye
- 106.** Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae’de genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların “isoelectric focusing” ve PCR ile araştırılması, 6. Antimikrobik KemoterapiGünleri, Poster No.19, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul (2004).
- 107.** Ramdani-Bouguessa N, Mendonca N, Leitao J, Ferreira E *et al.* CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. J Clin Microbiol. 2006; 44(12): 4584-6
- 108.** Neonakis IK, Scoulica EV, Dimitriou SK, Gikas AI *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. Microb Drug Resist. 2003; 9(2): 161-5.
- 109.** Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M *et al.* Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(3): 628-33.
- 110.** Soge OO, Queenan AM, Ojo KK, Adeniyi BA *et al.* CTX-M-15 extended-spectrum (beta)-lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2006; 57(1): 24-30.

