

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

131800

HASTANE KÖKENLİ *ENTEROBACTERIACEAE*
ÜYELERİNDE BETA LAKTAMAZLARIN
ARAŞTIRILMASI VE TIPLENDİRİLMESİ

Hüseyin TAŞLI

DANIŞMAN

Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR

131800

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

İZMİR
2003

“Hastane Kökenli *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Beta Laktamazların Araştırılması Ve Tiplendirilmesi” ismli bu tez 20.06.2003 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.



Jüri Başkanı
Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Zeynep Gülay



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Meral SAKIZLI



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Güner COŞAR



Jüri Üyesi
Yard. Doç. Dr. Hüseyin BASKIN



TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve bu çalışmada bana her türlü desteği veren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR'a, yetişmemde ve tez çalışmamda büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a, doktora eğitimime başlamamı sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Güner COŞAR ve Sayın Prof. Dr. Nuran YULUĞ'a, doktora süresince her zaman destek aldığım Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU'na, yetişmemde emeği geçen diğer tüm hocalarıma, yardımları ve her zaman hatırlayacağım dostlukları için çalışma arkadaşlarıma, ayrıca desteği ve anlayışı için eşim Uz. Dr. Funda TAŞLI'ya teőkükür ederim.



İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	I
ŞEKİL LİSTESİ	I
RESİM LİSTESİ	I
KISALTMALAR	II
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler	6
4.1.1. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	6
4.1.2. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi	7
4.1.2.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi	8
4.1.2.1.1. Beta-Laktam Direncinde Porin Permeabilitesinin Rolü	8
4.1.2.1.2. Aktif Pompa (efluks) Sistemleri	8
4.1.2.2. Penisilin Bağlayan Protein Değişimleri	9
4.1.2.3. İlacı Parçalayan Beta-Laktamaz Enzimlerinin Sentezlenmesi.	9
4.2. Beta-Laktamazlar	9
4.2.1. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması	12
4.2.2. Beta-Laktamazların Adlandırılması	13
4.2.3. Gram Pozitif Bakterilerin Beta-Laktamazları	14
4.2.4. Gram olumsuz Bakterilerin Güncel Önem Taşıyan Beta-Laktamazları	14
4.2.4.1. Kromozomal Beta-Laktamazlar	14
4.2.4.2. Plazmid Aracılığı İle Sentezlenen Beta-Laktamazlar	16
4.2.4.2.a. TEM ve SHV beta-laktamazlar	18
4.2.4.2.b. Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	18
4.2.4.2.b.1. GSBL Tipleri	19
4.2.4.2.b.1.1. TEM Tipi GSBL'ler	19
4.2.4.2.b.1.2. SHV Tipi GSBL'ler	21
4.2.4.2.b.1.3. İnhibitor Dirençli Beta-Laktamazlar	23
4.2.4.2.b.1.4. CTX-M Tipi GSBL'ler	24
4.2.4.2.b.1.5. OXA Tipi GSBL'ler	24
4.2.4.2.b.1.6. Diğer GSBL'ler	25
4.2.4.2.b.2 GSBL Araştırma Yöntemleri	25
4.2.4.2.b.2.1. Fenotipik Yöntemler	25
4.2.4.2.b.2.2. Moleküler Tanı Yöntemleri	28
4.2.4.2.b.3. GSBL'lerin Tıbbi Önemi	29
4.2.4.2.b.4. Epidemiyoloji	31
4.2.4.2.c. Plazmid kontrolündeki AmpC Beta-laktamazlar	32
4.2.4.2.d. Karbapenemazlar	33

5. GEREÇ VE YÖNTEM	34
5.1. GEREÇ	34
5.1.1. Çalışma Grubu	34
5.1.2. Araçlar	34
5.2. YÖNTEM	37
5.2.1. Plak Konjugasyon Deneyi	37
5.2.2. Plazmid Ekstraksiyonu ve Restriksiyon Analizi	38
5.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	41
5.2.4. Beta-laktamaz çalışmaları	42
5.2.4.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların (GSBL) Araştırılması	42
5.2.4.2. İndüklenebilir Beta-Laktamazların (İBL) Araştırılması	42
5.2.4.3. Beta-Laktamaz Eldesi	43
5.2.4.4. Beta-Laktamazların İzoelektrik Odaklama (Isoelectric Focusing; IEF) Yöntemi İle İncelenmesi	43
5.2.5. PCR İle bla _{TEM} Ve bla _{SHV} Beta-Laktamaz Genlerinin Saptanması	44
5.2.6. SHV PCR Ürünlerinin NheI Restriksiyon Enzimi İle Kesilmesi	46
5.2.7. DNA Dizi Analizi	46
6. BULGULAR	50
6.1. İzolatların Genel Özellikleri	50
6.2. Konjugasyon Deneyi İle Direnç Aktarımı Bulguları	51
6.3. Plazmid Analizi	51
6.4. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	56
6.5. GSBL Varlığı	56
6.6. İzoelektrik Odaklama Bulguları	61
6.7. TEM ve SHV PCR Sonuçları	62
6.8. SHV PCR / NheI Restriksiyon analizi	62
6.9. DNA Dizi Analizi Bulguları	67
7. TARTIŞMA	70
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
9. KAYNAKLAR	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Beta-laktamlar ve direnç problemleri.....	7
Tablo 2. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişim mekanizmaları.....	10
Tablo 3. Beta-laktamazların sınıflandırılması	13
Tablo 4. Bazı plazmid kökenli beta-laktamazların özellikleri.....	17
Tablo 5. TEM tipi beta-laktamazların özellikleri	20
Tablo 6. TEM GSBL türevlerinde amino asit değişiklikleri.....	21
Tablo 7. SHV tipi beta-laktamazların özellikleri	22
Tablo 8. SHV GSBL türevlerinde amino asit değişiklikleri	22
Tablo 9. Türkiyede hastane kökenli <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> türlerinde GSBL sıklığı	32
Tablo 10. PCR'da kullanılan Öncül setleri	44
Tablo 11. Ampisilin dirençli izolatların türlere göre dağılımı.....	50
Tablo 12. izolatların direnç aktarım oranları	51
Tablo 13. Trabskonjugantların plazmid profili	54
Tablo 14. 59 transkonjugantta plazmidlerin bulunma sıklığı	55
Tablo 15. Konjugasyon (+) 74 izolat ve transkonjugantlarının beta-laktam ajanlara duyarlılıkları.....	57
Tablo 16. Ampisilin dirençli izolatlarda GSBL ve İBL varlığı.....	58
Tablo 17. Verici kökenlerde ve transkonjugantlarda GSBL dağılımı	58
Tablo 18. Transkonjugantlara göre beta-laktamazların izoelektrik noktaları.....	59
Tablo 19. TEM, SHV PCR ve SHV/NheI restriksiyon bulguları	62
Tablo 20. Verici kökenlerin ve transkonjugantların özelliklerinin gruplandırılması	65
Tablo 21. Beta-laktamaz tipleri ve SHV enzimlerindeki aminoasit değişiklikleri.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Plazmid büyüklüğü hesabı.....	52
Şekil 2. TEM nükleotid dizileri.....	68
Şekil 3. SHV nükleotid dizileri.....	69

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Plazmid band görünüşleri	53
Resim 2. IEF sonrası beta-laktamaz bandları	61
Resim 3. TEM-PCR bant örnekleri	63
Resim 4. SHV-PCR bant örnekleri	63
Resim 5. SHV/NheI restriksiyon analizi örnekleri	64

KISALTMALAR

AMC	: Amoksisilin/klavulanat
AMP	: Ampisilin
AMX	: Amoksisilin
ATM	: Aztreonam
bp	: Baz çifti
CAZ	: Seftazidim
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
ÇDS	: Çift disk sinerji
FOX	: Sefoksitin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
IEF	: Isoelectric Focusing (İzoelektrik odaklama)
IPM	: İmipenem
İBL	: İndüklenebilir beta-laktamaz
MÇDS	: Modifiye çift disk sinerji
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	: Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PCR-RFLP	: PCR-restriction fragment length polymorphism
PCR-SSCP	: PCR-single strand conformation polymorphism
pI	: İzoelektrik nokta

1. ÖZET

Hastane Kökenli *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Beta-Laktamazların Araştırılması ve Tiplendirilmesi

Hüseyin TAŞLI

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) Türkiye de dahil tüm dünyada yaygın olarak bulunmakta ve gittikçe büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Sıklıkla klinik *Enterobacteriaceae* izolatları tarafından sentezlenen enzimlerdir ve çalışılan hastaneye ve kullanılan yöntemlere göre GSBL oluşturan bakteriler ve oranları değişmektedir. Bu çalışmada klinik *Enterobacteriaceae* kökenlerinde fenotipik ve genotipik yöntemlerle plazmid kökenli TEM, SHV tipi beta-laktamazların ve bunların GSBL türevlerinin araştırılması, ve de DNA dizi analizi ile GSBL enzimlerinin tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde, Nisan-Aralık 2000 tarihleri arasında klinik örneklerden soyutlanan 91 *Klebsiella pneumoniae*, 53 *Escherichia coli*, beş *Enterobacter cloacae*, beş *Klebsiella oxytoca*, üç *Enterobacter aerogenes*, üç *Morganella morganii* ve iki *Citrobacter freundii* olmak üzere toplam 166 ampisilin dirençli köken incelenmiştir. Bu kökenlerin %38'inde GSBL varlığı saptanmış olup, bu oran *K.pneumoniae* ve *E.coli* kökenlerinde sırasıyla %57.1 ve %17 olarak bulunmuştur. Konjugasyon deneyi ile kökenlerin %44.6'sının dirençlerini alıcı *E.coli* K-12 kökenine aktarabildikleri görülmüştür. GSBL aktarım oranı ise %73 düzeyinde gerçekleşmiştir. Transkonjugantlarda, büyüklükleri 7-212 kb arasında olan 18 farklı plazmid ve 36 farklı plazmid profili elde edilmiş, en sık (%33.9) büyüklüğü 67 kb olan plazmid gözlenmiştir. İzoelektrik odaklama bulgularına göre transkonjugant enzim ekstrelerinin 1-4 ayrı bant içerdiği, bunların arasında izoelektrik noktaları 5.4 (%52.7) ve 7.6 (%28.4) olan bantların en sık olduğu görülmüştür. PCR ile transkonjugantların %52.7'sinde TEM, %74.3'ünde SHV, %32.4'ünde TEM ve SHV genleri birlikte saptanmıştır. TEM genleri *E. coli* (%87.5), SHV genleri ise *K. pneumoniae*'da (%93.3) daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Transkonjugantlarda saptanan toplam 46 GSBL'den 45'inin SHV tipi olduğu SHV PCR/NheI restriksiyon analizi ile gösterilmiştir. Transkonjugantların 18'inde (dokuz TEM + SHV, dokuz SHV) PCR ile çoğaltılan TEM ve SHV genlerinin dizi analizi sonucunda bir örnekte SHV-1, beş, yedi ve beş örnekte sırasıyla GSBL özelliğinde SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 saptanmıştır. TEM-1'in, dört örnekte SHV-2, üç örnekte SHV-5 ve iki örnekte SHV-12 ile birlikte yer aldığı görülmüştür. Bu çalışma ile, ulaşılabilen kaynaklara göre ülkemizde DNA dizi analizi ile SHV tipi GSBL'lerin tiplendirilmesi ilk kez uygulanmıştır. Dünyada belirli ülkelerde saptanan SHV-12'nin hastanemizde de bulunduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Beta-laktamaz, TEM, SHV, *Enterobacteriaceae*.

2. SUMMARY

The Investigation and Typing of Beta-Lactamases in The Members of Hospital-Based *Enterobacteriaceae*

Hüseyin TAŞLI

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have been widely found worldwide including Turkey, and they are emerging as a serious problem. They are enzymes usually synthesized by clinical isolates of *Enterobacteriaceae* sp, the type and the ratio of which varies depending on the hospital and the procedures being used. In this study, our aims are detecting plasmid mediated β -lactamases like TEM or SHV, and their ESBL derivatives by phenotypic and genotypic methods, and also typing of ESBLs by DNA sequencing.

We investigated a total number of 166 ampicillin-resistant clinical isolates composed of 91 *Klebsiella pneumoniae*, 53 *Escherichia coli*, five *Enterobacter cloacae*, five *Klebsiella oxytoca*, three *Enterobacter aerogenes*, three *Morganella morganii*, and two *Citrobacter freundii* which were isolated at the Research and Practice Hospital of Dokuz Eylül University, in the April-December 2000 period. We found ESBLs in 38% of these isolates; the corresponding percentages for *K. pneumoniae* and *E. coli* strains being 57.1% and 17%, respectively. In the conjugation experiments 44.6% of the isolates were detected to transmit their resistance to recipient *E. coli* K-12 strain. The percentage of ESBL transmission was 73%. There were 18 different plasmids and 36 different plasmid profiles at the sizes of 7-212 kb in transconjugants, with the most frequent (33.9%) plasmid size of 67 kb. By the isoelectric focusing results, the transconjugant enzyme extracts contained 1 to 4 different bands, mostly at the isoelectric points of 5.4 (52.7%) and 7.6 (28.4%). Using PCR, it is found that of the transconjugants 52.7% included TEM, 74.3% included SHV, and 32.4% included both of the TEM and SHV genes. TEM genes were more common among *E. coli* (87.5%), whereas SHV genes were mostly found among *K. pneumoniae* (93.3%). Using PCR / *NheI* restriction analysis, 45 of the 46 ESBL detected at transconjugants were determined to be SHV type. In 18 transconjugants (nine including both TEM and SHV, nine only SHV) the TEM and SHV genes were amplified using PCR; in the sequence analysis of these genes SHV-1 was found in one sample; and having ESBL property SHV-2, SHV-5, and SHV-12 were detected in five, seven, and five samples, respectively. TEM-1 was found along with SHV-2 in four, with SHV-5 in three, and with SHV-12 in two samples. As far as we know, the typing of SHV type ESBL using DNA sequence analysis is applied for the first time in Turkey, in the current study. The SHV-12 which had been detected in several countries in the world was also found in our hospital.

Key words: Beta-lactamases, TEM, SHV, *Enterobacteriaceae*.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterik Gram olumsuz basiller 30 yılı aşkın bir süredir hastane kökenli patojenler arasında ön sırada gelmektedir. Bu mikroorganizmalar çeşitli mekanizmalar ile yeni geliştirilen bir çok antibiyotiğe direnç kazanmışlardır (1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda Gram olumsuz nozokomiyal patojenler arasında *Enterobacteriaceae* üyelerinin ilk sırada veya *Pseudomonas* türlerinden sonra geldiği görülmektedir (2).

Beta-laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların sağaltımında kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir. Yeni geliştirilen beta-laktam ajanların kullanıma girmesine paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta-laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (3).

Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram olumsuz patojenlerde, beta-laktam antibiyotik direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz sentezidir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler, beta-laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından inaktive edilebilir. Beta-laktam ajanların yaygın kullanımı, beta-laktamazların evrimsel değişikliklere uğramasına, sayı ve etki spektrumlarının inanılmaz bir ivme ile artmasına neden olmuştur. 1995'den 2000 yılına kadar bazı önemli beta-laktamaz gruplarında enzim sayısı hemen hemen iki katına çıkmıştır. Günümüzde klinik izolatlardan köken alan, amino asit dizileri veya fenotipik özellikleri farklı en az 340 beta-laktamaz tanımlanmıştır (4).

Enterobacteriaceae üyelerinin çok çeşitli beta-laktamaz enzimleri vardır. Beta-laktamazları kodlayan genler; plazmidler, transpozonlar ve bakteri kromozomunda yer alabilir (5). Yaygın olarak plazmid kaynaklı beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi) üretir ve bu enzimleri plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarırlar (6-9).

Plazmid kaynaklı beta-laktamazlar, Mikrobiyoloji laboratuvarında sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları, plazmidlerce bakteriden bakteriye geçişlerinin kolay olması nedeniyle klinik açıdan ön plandadırlar. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri, penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinleri etkin olarak hidrolize ettikleri halde, 3. kuşak sefalosporinlere etkisizdirler. Ancak 1980'li yıllarda genişlemiş spektrumlu beta-laktam ajanların yaygın kullanımı ve bu ajanların seçici etkileri sonucunda TEM-1 ve SHV-1 enzimlerinden nokta

mutasyonu sonucu türev alan; çok sayıda, nakledilebilen ve özellikle oksimino beta-laktamları inaktive eden yeni enzimler tanımlanmıştır. Bu enzimlerin özellikle oksimino-beta-laktamlara karşı etki spektrumlarının geniş olması nedeniyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmışlardır (5). Günümüze 150'den fazla GSBL tanımlanmıştır (10).

GSBL'ler tüm dünyada çok sayıda izole edilen beta-laktamazların majör grubunu oluşturur ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların sürekli büyüyen bir koludur. Çoğunlukla da hastane kökenli *Enterobacteriaceae* üyeleri tarafından eksprese edilirler. En sık *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında olmak üzere diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde saptanmaktadır (11,12). Bu enzimleri kodlayan genlerin hareketli elementler üzerinde yer alması nozokomiyal patojenler arasında yayılımını kolaylaştırmıştır (13,14).

GSBL meydana getiren *Enterobacteriaceae*'ların artan prevalansı, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığını doğru olarak belirleyecek laboratuvar testlerine gereği arttırmıştır. GSBL üreten suşların rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile belirlenmeleri güçtür. GSBL'lerin çoğu bir veya daha fazla oksimino-beta-laktama dirençli olmasına rağmen rutin testlerde duyarlı görülebilirler (15). GSBL'ler klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır (16). Bu özelliklerinden yola çıkılarak saptanmalarında National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) doğrulama testi, çift disk sinerji (ÇDS), üç boyutlu test, E test gibi özel yöntemler geliştirilmiştir (7,17-19).

GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın tespit edilmesi varolan GSBL'leri göstermek için yeterli idi. Ancak sayıları 90'ın üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan, bu test uzun süre yararlı olamamış olup, aynı durum diğer enzim grupları için de geçerlidir (10).

Fenotip temeline dayalı doğrulama yöntemlerden hiç birisi Gram olumsuz klinik izolatlarda GSBL varlığını doğru saptamada %100 duyarlı ve özgül değildir. Beta-laktamazların aşırı üretimi, birkaç enzimin bir arada bulunması veya beta-laktamaz direncine diğer direnç mekanizmalarının eşlik etmesi de yanlış test sonuçlarına neden olmaktadır (20-26). Klinik izolatlarda GSBL'nin doğru tanımlanması gerekliliği artık iyice anlaşılmıştır (27).

Günümüzde spesifik enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gerek vardır. En sık Polymerase Chain Reaction (PCR) tabanlı testler olmak üzere oligotiplendirme yaygın kullanılan yöntemlerdir (28-34). DNA dizi analizi spesifik beta-laktamaz genlerini saptamada halen standart olma özelliğini korumaktadır (35).

Ülkemizde, GSBL ile ilgili çalışmalar klinik izolatlar üzerinde yoğunlaşmış ve bu enzimlerin yüksek oranda saptandığını göstermiştir (36-39). Son çalışmalara göre Türkiye, Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığının en yüksek olduğu ilk üç ülke arasındadır (40). GSBL'lerin, tüm dünyada hızla artması ve salgınlar, sağaltım başarısızlığı, artan mortalite gibi ciddi klinik problemlere neden olması doğru saptanmaları ve tiplendirilmelerini gerekli kılmaktadır. Bu sayede rasyonel antibiyotik kullanım politikası belirlenebilir ve beta-laktam direnci ile savaşılabilir.

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi klinik örneklerinden soyutlanan *Enterobacteriaceae* üyelerinde fenotipik ve genotipik yöntemlerle plazmid kökenli TEM ve SHV tipi beta-laktamazlar ve bunların GSBL türevlerinin araştırılması, DNA dizi analizi ile GSBL enzimlerinin tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktamlar
4. Karbapenemler
5. Beta-Laktamaz İnhibitörleri (Klavulanik asit, Sulbaktam, Tazobaktam)

Bu grupta kimyasal yapısı, farmakolojisi ve antibakteriyel etki spektrumu farklı birçok antibiyotik yer alır. Bu antibiyotiklerin ortak özelliği yapılarında beta-laktam halkası taşınmalarıdır. Bir beta-laktam antibiyotiğin özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlar sadece beta-laktam halkasından oluşur, monosiklik yapıdadır. Beta-laktamaz inhibitörleri beta-laktam antibiyotik olmalarına rağmen tek başlarına antibakteriyel etkileri pratik olarak yoktur (41,42).

4.1.1. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta-laktam halkası bakteri duvar sentezinde kullanılan disakkarid peptidlerin karboksi terminali ile yapısal benzerlik gösterirler. Bu benzerlikten dolayı tüm beta-laktam antibiyotikler bakterilerin sitoplazmik membranları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezini sağlayan penisilin bağlayan protein (PBP) adı verilen hedef proteinlere bağlanarak etkilerini gösterirler. PBP'lerin inhibe edilmesi, hücre duvar sentezin durduracağından bakterinin ölümüyle sonuçlanır (43).

Beta-laktam antibiyotiklerin hücre zarındaki PBP'lere bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için Gram olumsuz bakterilerde porin (Outer Membran Protein: OMP) kanallarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir (43).

4.1.2. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi

Beta-laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların sağaltımında kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta-laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (3).

Bakteriler beta-laktam antibiyotiklere karşı üç temel yolla direnç geliştirirler (44):

1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi,
2. Hedef PBP yapısında değişiklik,
3. İlacı parçalayan beta-laktamaz enzimlerinin sentezlenmesidir.

Gram olumlu bakterilerde dış membran olmadığından ilk mekanizma ile direnç gelişmesi söz konusu değildir, ikinci mekanizma daha sık görülür. Buna karşın Gram olumsuz bakterilerde her üç mekanizma ile de direnç gelişebilmektedir. Genel olarak antibiyotiklere direnç birbiri ile uyumlu çalışan bir dizi mekanizma aracılığıyla gelişmektedir. Beta-laktam antibiyotiklere direnç de sıklıkla yukarıda sayılan mekanizmaların birkaçının ortak etkilerinin bir sonucudur (1). Beta-laktam ajanlar ve güncel direnç problemleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Beta-laktamlar ve direnç problemleri

Beta-laktam sınıfı	Direnç problemi
Penisilinler	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> * Penisiline duyarlılığı azalmış <i>Streptococcus pneumoniae</i> Ampisiline dirençli <i>Haemophilus influenzae</i>
Beta-laktamaz inhibitörleri	<i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin kromozomal AmpC tipi beta-laktamazların aşırı üretimi Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar İnhibitörlere dirençli TEM enzimleri (İRT) TEM-1 aşırı üretimi
Sefalosporinler	Kromozomal AmpC tipi beta-laktamazları aşırı üreten <i>Enterobacteriaceae</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GSBL üreten <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar
Monobaktamlar	Kromozomal veya plazmid kökenli AmpC tipi enzim üreten türler GSBL yapan <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri
Karbapenemler	Metallo-beta-laktamaz (IMP ve VIM-tipi) OXA-tipi karbapenem hidrolize eden beta-laktamaz üreten nonfermentatif basiller

Tablo kaynak “3” ten aynen alınmıştır. *Tüm beta-laktamlara dirençlidir.

4.1.2.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi

4.1.2.1.1. Beta-Laktam Direncinde Porin Permeabilitesinin Rolü

Genellikle gram olumlu bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı permeabilite engeli bulunmamasına karşın, Gram olumsuz bakterilerde dış membran, beta-laktam antibiyotiklere karşı doğal bir engel oluşturmaktadır. Beta-laktam molekülleri, bakteri hücreindeki hedeflerine ulaşabilmek için dış membranda bulunan porinlerden geçmek zorundadır. Kromozomal mutasyonlar sonucu porin proteinlerinde oluşan değişiklikler geçirgenlikte bir azalmaya, bunun sonucunda da çeşitli penisilinler, sefalosporinler ve hatta karbapenemlere karşı direnç gelişimine yol açmaktadır. Bu tip direnç, özellikle enzimatik direnç ile birlikte bulunduğu büyük sorunlara neden olmaktadır (45).

Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca iki kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir Gram olumsuz bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteininin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir (46). *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnci, azalmış dış membran geçirgenliği ile sefalosporinazların aşırı üretimi veya genişlemiş spektrumlu bir beta-laktamaz varlığı kombinasyonuna bağlıdır. Bu durum özellikle *Enterobacter* türleri ve *K. pneumoniae*'da görülmektedir (47).

4.1.2.1.2. Aktif Pompa (efluks) Sistemleri

Antimikrobiyal ajanın hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinin varlığı 20 yıl kadar önce tetrasiklinler için belirlenmiştir. Günümüzde ise bu mekanizmanın beta-laktamların da aralarında bulunduğu birçok antibiyotik sınıfına karşı doğal veya kazanılmış dirençte önemli olduğu anlaşılmıştır. Hatta Gram olumsuz bakterilerin çeşitli antibiyotiklere doğal direncindeki temel rolü, eskiden sanıldığı gibi dış membran değil, aktif pompa sistemlerinin oynadığı belirlenmiştir (3).

4.1.2.2. Penisilin Bağlayan Protein Değişimleri

PBP'lerin yapısındaki değişim beta-laktam direncinde önemli bir mekanizma olup bazı Gram olumlu koklarda ve *Pseudomonas*'larda gözlenmiştir. Kromozomal mutasyonlar sonucunda PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere karşı ilgilerinde azalma olabilir. Bu da beta-laktamlara karşı göreceli ya da tam bir dirence yol açabilir. PBP'lere bağlı direnç, penisiline dirençli *S. pneumoniae*'da, metisiline dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de, penisiline dirençli *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis*'de, ampisiline dirençli *H. influenzae*'da ve penisilin ve sefalosporinlere dirençli enterokoklarda kesin olarak gösterilmiştir (1,48).

4.1.2.3. İlacı Parçalayan Beta-Laktamaz Enzimlerinin Sentezlenmesi.

Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram olumsuz patojenlerde, beta-laktam antibiyotik direncindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz sentezidir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler, beta-laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından inaktive edilebilirler (4).

Beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Bakteriler tarafından ya kromozomlar ya da plazmidler veya transpozon adı verilen transfer edilebilir genetik elemanlar aracılığı ile sentez edilirler (46). Günümüzde klinik izolatlardan köken alan, amino asit dizileri veya fenotipik özellikleri farklı en az 340 beta-laktamaz tanımlanmıştır (4). Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişim mekanizmaları ve örnek bakteriler Tablo 2'de görülmektedir.

4.2. Beta-Laktamazlar

Beta-laktamaz enzimi ilk kez 1929'da bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığı biçiminde Fleming tarafından gözlemlenmiş, 1940 yılında Abraham ve Chain ise *E. coli*'den elde ettikleri ekstrenin penisilinün etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar elde ettikleri enzime "penisilnaz" adını vermişlerdir (49).

Tablo 2. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişim mekanizmaları

Temel direnç mekanizması	Özel mekanizma	Örnek bakteri
Penisilin bağlayan proteinlerde değişim	PBP'lerin beta-laktamlara bağlanma afinitesini azaltan değişiklikler Hücrede bulunan PBP'lerde değişim Yakın türlerden transformasyon ile gen aktarımı ve homolog rekombinasyon ile mozaik gen oluşumu PBP genlerinde nokta mutasyonlar Yeni PBP yapımı	Penisiline dirençli <i>S.pneumoniae</i> Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli <i>H. influenzae</i> Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA)
Beta-laktam antibiyotiği parçalayan enzim (beta-laktamaz) üretimi	Beta-laktamaz üretiminin arttırılması Daha etkin bir promoter kazanımı (mutasyon veya genetik aktarım) Beta-laktamaz kontrol mekanizmalarının bozulması Varolan beta-laktamazlarda etki spektrumu değiştirecek mutasyonların oluşması TEM-1, TEM-2, SHV-1 beta-laktamaz genlerinde nokta mutasyonları ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sentezi Genetik aktarım ile yeni beta-laktamaz genlerinin kazanılması	<i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri İndüklenebilir beta-laktamazı olan türlerdeki (<i>E. cloacae</i> , <i>P. aeruginosa</i> vb.) AmpD geni defektli dereprese mutantlar Başta <i>K. pneumoniae</i> olmak üzere tüm <i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. faecalis</i> 'in stafilokokal beta-laktamaz geni
İlacın hücredeki etkin konsantrasyonunun azaltılması	İlacın girişinin azalması (porin protein değişimi veya kaybı) İlacı dışarı atan aktif pompa sistemleri	<i>E. coli</i> OmpF ve OmpC mutasyonları <i>P. aeruginosa</i> 'nın üç elemanlı pompa sistemleri

Kaynak "3" ten aynen alınmıştır

Yine 1940'larda Kirby uygun disk duyarlılık testlerini geliştirdikten sonra 1944 yılında stafilokokların penisiline duyarlı ve dirençli suşlarını karşılaştırdığında penisiline duyarlı olanlarda bu enzimin bulunduğunu saptamıştır. Çalışmalar 1960'lı yıllara kadar stafilokokların penisilinazları üzerinde yoğunlaşmış, bu ilacın yaygın kullanımı sonucu önce hastanelerde, daha sonra da toplumda stafilokoklarda penisilin direnci büyük bir artış göstermiştir (5,49).

1960'lerden sonra semisentetik penisilinler, metisilin ve ampisilin, 1. kuşak sefalosporinlerden de sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesiyle gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlar önemli bir direnç mekanizması durumuna gelmiştir. Bunun nedeni tamamen antibiyotik kullanımı ile ilişkilidir. Metisilin ve ampisilin kullanıma girmesiyle penisiline dirençli stafilokokların yayılımı azalmış, gram olumsuz bakterilerin oranı artmıştır. Gram olumsuz bakterilerde çok daha fazla çeşitte beta-laktamaz bulunduğu ve plazmid kontrolünde sentezlenebildiğinden çok kısa sürede dirençte artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak ilaç endüstrisinde tamamen yeni grup beta-laktam ilaçlar geliştirilmiş, ancak bilindiği gibi bunlara karşı da yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır (5,49).

Penisilin klinik tedaviye girmesini izleyen 20-25 yıl boyunca beta-laktamazların sayısı ve çeşitleri oldukça kısıtlı kalmıştır. Bu dönemde Gram olumsuz bakterilerin çoğunun TEM-1, *K. pneumoniae* suşlarının SHV-1 ve *S. aureus* suşlarının bir penisilinaz ürettiği görülmektedir. Ancak, 1978-1980 yıllarında, klinik tedaviye toprak bakterilerince üretilen yeni beta-laktam ajanların (sefamisinler, karbapenemler, sulfonlar, monobaktamlar) girmesiyle beta-laktamaz tiplerinin de hızla arttığı izlenmektedir (3).

Beta-laktamazlarla hidrolize olmaya dirençli olmaları nedeniyle 1980'li yıllarda 3. kuşak sefalosporinler yaygın kullanım alanı bulmuştur. 1983 yılında Almanya'da *K. pneumoniae* suşlarında, 3. kuşak sefalosporinleri de parçalayan plazmid kaynaklı bir beta-laktamaz bulunmuştur (50). Bu yeni beta-laktamaz *Klebsiella* türlerinde sık olarak bulunan SHV-1 beta-laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 enzimidir. Bunun ardından Fransa'da seftazidime dirençli *K. pneumoniae* suşlarında, seftazidimi hidrolize eden TEM-2 enziminden yalnız iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı beta-laktamaz belirlenmiştir (51).

Beta-laktam ajanların yaygın kullanımı, beta-laktamazların evrimsel değişikliklere uğramasına, sayısı ve etki spektrumlarının inanılmaz bir ivme ile artmasına neden olmuştur. 1995'den 2000 yılına kadar bazı önemli beta-laktamaz gruplarında enzim sayısı hemen hemen iki katına çıkmıştır. (4).

4.2.1. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Çok sayıda beta-laktamaz çoğunlukla Gram olumsuz bakterilerde olmak üzere, Gram-olumlu ve anaerop bakteriler tarafından sentezlenir. Beta-laktamazlar için farklı zamanlarda bir çok sınıflandırma şeması önerilmiştir. Bu sınıflandırmalar içinde en çok ikisi kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi, beta-laktamazların substrat profilleri ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarını temel alır. Ambler tarafından 1980 yılında yapılmış olan ikinci sınıflandırma ise enzimlerin nükleotid ve aminoasit dizilerine dayanan moleküler sınıflandırmadır (5).

Dizileri bugüne değin belirlenebilen beta-laktamazlar moleküler sınıflandırmada A,B,C ve D olmak üzere dört moleküler sınıfta toplanmaktadır. A, C ve D sınıfları aktif bölgelerinde "serin" içermekte, B sınıfında ise aktif bölgede "çinko" bulunmaktadır. Ambler sınıf A enzimleri çoğunlukla plazmid kontrolunda olan penisilinazlardır. Sınıf B beta-laktamazlar, aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı bir tiyol grubu bulunan metalloenzimlerdir. Bu enzimlerin çoğu karbapenemaz aktivitesi taşımaktadır. C sınıfı enzimler sefalosporinazdır ve çoğunlukla kromozom kontrolundadır. Kromozomal AmpC geni tarafından kodlandıkları için, AmpC tipi enzimler olarak da bilinirler ve *Salmonella* spp. haricinde tüm Gram olumsuz basillerde bulunan beta-laktamazlardır. D sınıfı enzimler oksasilinazlardır ve oksasilini hızla hidrolize ederler (5, 52).

Beta-laktamazların yapısal özelliklerinin yanısıra substrat profilleri, inhibitörlere duyarlılık gibi işlevsel özelliklerinin de değerlendirildiği en yeni ve en yaygın kullanılan sınıflandırma şeması 1995 yılında yapılan Bush, Jacoby ve Mederios sınıflandırmasıdır (52). Bu sınıflandırma 1989 yılında Bush'un yaptığı sınıflandırmanın bir uyarlamasıdır (53) ve aynen Bush'un sınıflandırmasında olduğu gibi enzimler 4 ana grupta toplanmıştır. Beta-laktamazların sınıflandırılması ve karşılaştırılması Tablo' 3 de gösterilmiştir (52,54).

Tablo 3. Beta-laktamazların sınıflandırılması

Bush Jacoby Medeiros Grup	Molekül sınıfı	Tercih edilen substrat	İnhibisyon		Örnek enzimler
			KA	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	-	-	Gram-olumsuz bakterilerin kromozomal ve plazmid kökenli AmpC enzimleri (MIR-1, BIL-1, MOX-1, CMY-1, LAT-1, FOX-1, ACT-1)
2a	A	Penisilinler	+	-	Gram-pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-19, SHV-25, TLE-2, ROB-1, OHIO-1, HMS-1
2be	A	Penisilinler, Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, Monobaktamlar	+	-	TEM-3-29, TEM-42,43, TEM-47-50,TEM-92 SHV-2-9, SHV-12-18, SHV-20-24 PER-1,2. CTX-M-1-16. GES-1,2. VEB-1,2. TOHO-1,2. <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Penisilinler	±	-	TEM-30-36, TEM 38-41, 44, 45, 51,59,.....83 SHV-10
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3-5, BRO-1-3, SAR-1
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	±	-	OXA tipi enzimler (OXO-1-31) Dar spektrum: OXA-1-10, OXA-20,27,30,31 GSBL etkili: OXA-11-19, OXA-28 Karbapenem hidrolizi yapanlar: OXA-23-27
2e	A	Sefalosporinler	+	-	<i>P. vulgaris</i> 'in İndüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	+	-	<i>E. cloacae</i> 'nin IMI-1 ve NMC-A enzimleri <i>S. marcescens</i> 'in Sme-1 ve 2 enzimleri <i>K. pneumoniae</i> 'nin KPC-1 enzimi
3	B	Tüm beta-laktamlar (monobaktamlar hariç)	-	+	<i>S. maltophilia</i> 'nin L1 ve <i>B. fragilis</i> 'in CcrA enzimi, <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. Baumannii</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>K. pneumoniae</i> türlerinde IMP-1-8 ve <i>P. aeruginosa</i> 'da VIM-1-3 enzimleri
4	?	Penisilinler	-	?	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nin penisilinazları

Kaynak '52' ve '54' den uyarlanmıştır. KA: Klavulanik asit

4.2.2. Beta-Laktamazların Adlandırılması

Beta-laktamazların adlandırılmasındaki farklı yaklaşımlar, bu enzimleri gördüklerinden daha karmaşık bir hale getirmiştir. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları genlerine (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bazıları da bulan kişilere göre (HMS) ad almışlardır (55). Buna karşın, bunlardan

bazıları geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin, SHV, sülfidril variabil'dan kısaltılmıştır, buna karşın artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Benzer biçimde, ilk kez *Pseudomonos*'dan izole edilmiş olan PSE enziminin artık enterobakterilerde de bulunabildiği bilinmektedir (5). Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitör rezistan TEM) gibi tanımlayıcı adlar verilmiş ve bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise, TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM-26, TEM-43 gibi numara ile belirtilmesidir (55).

4.2.3. Gram Olumlu Bakterilerin Beta-Laktamazları

Beta-laktamazlarıyla önemli direnç problemi yaratan en yaygın Gram olumlu patojenler stafilokoklardır. Günümüzde plazmid transferi ve suş seleksiyonu yoluyla penisilinaz sentezleyen stafilokokların oranı % 80-90 yükselmiştir. Stafilokok enzimleri moleküler sınıf A, Bush grup 2a da yer almaktadır (5). Stafilokoklar dışındaki Gram olumlu bakteriler içinde beta-laktamaz sentezleyen en önemli bakterilerden biri *Enterococcus faecium*'dur. Gram olumlu bakterilerden *Bacillus* türlerinde kromozomal beta-laktamazlar bulunmaktadır. Gram olumlu anaerobik bakterilerden beta-laktamaz sentezlediği bilinen *Clostridium* türleri *C. butyricum*, *C. clostridioforme* ve *C. ramosum*'dur. Bu türlerin sentezlediği enzimler çoğunlukla kromozomal penisilinazlardır (40).

4.2.4. Gram Olumsuz Bakterilerin Güncel Önem Taşıyan Beta-Laktamazları

4.2.4.1. Kromozomal Beta-Laktamazlar

Kromozomal beta-laktamazlar Gram olumsuz basillerin hemen hepsinde yaygın olarak bulunmakta, ancak bunların miktarı, sentez yolu ve dirençteki rolleri farklıdır. Enterobakterilerin büyük çoğunluğu kromozomal enzimlere sahiptir. Bu enzimlerden bazıları (*K. pneumoniae*'nin SHV-1'i, *K. oxytoca*'nın K1'i) Ambler sınıf A'de yer alır (5).

Enterobakterilerin kromozomal enzimlerinin büyük çoğunluğu sınıf C'dedir. AmpC olarak da tanımlanan bu enzimler Bush sınıflandırmasına göre Grup 1' de yer almaktadır. Enzim ekspresyonu "indüklenebilir", "yüksek düzeyde yapısal" veya "düşük düzeyde yapısal" olabilir. Örneğin *E. coli* ve *Shigella*'daki enzim sentezi yapısaldır ve miktarı, dar spektrumlu sefalosporinlere direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeydedir. Buna karşın, *E. coli* izolatlarının %2' sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir (5).

P. aeruginosa, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* ve *P. rettgeri*' de bulunan Grup 1 beta-laktamazlar da *E. coli*' dekine benzemektedir, ancak bu enzimler bu bakterilerde indüklenebilen türdedir (5,56,57). Antibiyotik yokken çok düşük düzeyde olan enzim sentezi beta-laktam antibiyotiği varlığında yükselmektedir. AmpC'nin indüklenmesi için bakteride AmpC, AmpD, AmpG ve AmpR olmak üzere 4 gen bulunmalıdır. *E. coli*'de AmpC normalde düşük düzeyde üretilmektedir, ancak AmpR geni bulunmadığı için enzim indüklenemez (56,57). İndüksiyon etkisiyle yüksek miktarlarda sentezlenen enzim, indükleyicinin etkisi kalkınca tekrar bazal düzeyde sentezlenmeye başlanır. İndüklenebilir beta-laktamaza sahip bakterilerde mutasyon sonucu indüksiyona gerek olmaksızın devamlı yüksek düzeyde enzim sentezi (derepresyon) ortaya çıkabilmekte ve son yıllarda klinik izolatlarda sık olarak gözlenmektedir. Bu mutantlar, 3. kuşak sefalosporinler, sefuroksim, piperasilin ve aztreonam gibi zayıf indüksiyon yapıp bu beta-laktamazlara duyarlı olan beta-laktam antibiyotikler ile tedavi sırasında ortaya çıkabilir. Bunun nedeni söz konusu antibiyotikler indüksiyon yapmadığından düşük düzeyde enzim sentezleyen bakterileri öldürmekte, buna karşın dereprese mutantların seleksiyonuna yol açmalarıdır. AmpD geni defektli dereprese mutantların indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyen bakteri toplumlarında 10^{-5} - 10^{-7} sıklıkta ortaya çıkabildiği bildirilmektedir. Bu olay, enfeksiyonun yeri, ilacın ulaşabildiği düzey ve kullanılan beta-laktam antibiyotiği ile ilişkilidir. Pnömoni ve bakteriyemi gibi enfeksiyonlarda seleksiyon olasılığının yüksek olmasına karşın, üriner sistem enfeksiyonlarında, ulaşılan ilaç düzeyinin dereprese mikroorganizmalar için MK değerlerinin üzerinde olması nedeniyle düşük olduğu belirtilmektedir (5,56,57).

AmpC enzimlerine 4. kuşak sefalosporinler göreceli olarak dayanıklıdır. 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. Bu enzimler, aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik

asit ve sulfonların beta-laktam halkalarına bağlanmazlar. Bu nedenle de bu beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (3,58).

Dereprese suşlar in vitro testlerde dirençli bulunduğundan klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bildirişi açısından bir sorun yaratmamaktadır. Esas sorun indüklenebilen AmpC sentezleyen mikroorganizmalardadır. Bu tip suşlar bir hastadan izole edildiğinde üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı bulunabilir buna karşın bu ilaçlar klinikte kullanıldığında dereprese mutantlar seleksiyona uğrar ve tedavi başarısız olur. Bu riskin *Enterobacter* bakteriyemilerinde %20 lere çıktığı belirlenmiştir. Geçmişte, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia* spp, *Providencia* spp. ve *M. morgani* gibi türlerin üçüncü kuşak sefalosporinlere in vitro testlerde duyarlı görünseler bile dirençli olarak bildirilmeleri önerilse de (59) günümüzde bu kabul edilmeyen bir yaklaşımdır. Laboratuvardan İBL varlığı bildirilmese bile yukarıda sayılan türlerin bu özellikte olduğu bilinmelidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması bu nedenle büyük önem taşımaktadır. Bu türlerle gelişen infeksiyonlarda 2 ve 3. kuşak sefalosporinlerin ve aztreonamın tek başına kullanılmasından kaçınılması ve uzun süreli tedavi söz konusu ise bu türlerin antibiyotik duyarlılık testlerinin 3-4 günde bir tekrarlanması önerilmektedir (3).

4.2.4.2. Plazmid Aracılığı İle Sentezlenen Beta-Laktamazlar

Plazmidler bakteri hücre kromozomundan bağımsız, sitoplazmada yer alan çembersel DNA parçalarıdır. Taşıdıkları genetik şifre bakterinin yaşaması için mutlak gerekli değildir, bakteriyeye antibiyotik direnci gibi çevre koşullarına dayanma yeteneği sağlarlar (60). Bir plazmid üzerinde birden fazla antibiyotik direnç geni bulunabilir. Örneğin bir bakteri, plazmidleri üzerinde farklı beta-laktamazları kodlayan genlerle birlikte aminoglikozidleri parçalayan enzimi kodlayan genetik şifreyi birlikte taşıyabilir. Bakteriler plazmidleri aracılığıyla antibiyotik direnç genlerini birbirlerine aktarabilirler. Böylece plazmidin aracılık ettiği bir direnç kolayca bakteriler arasında yayılabilmektedir (61).

Plazmid aracılığı ile sentezlenen çok sayıda beta-laktamaz mevcuttur. Plazmid kaynaklı beta-laktamazları 1. Dar spektrumlu enzimler, 2. Oksasilinazlar, 3. Karbenisilinazlar, 4. GSBL'ler, 5. TEM, SHV veya OXA dışında diğer sınıf A oksimino-beta-laktamazlar, 6. Sefalosporinazlar ve 7. Karbapenemazlar biçiminde yedi grupta toplanmaktadır (Tablo 4) (60).

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

Tablo 4. Bazı plazmid kökenli beta-laktamazların özellikleri

Beta-laktamazlar	Sıklığı	Konak bakterisi	Spesifik özellikler
• DAR SPEKTRUMLULAR			
TEM-1	Çok sık	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Vibrio cholerae</i>	En yaygın plazmid kaynaklı beta-laktamaz, hemen hemen bütün bakterilerde bulunur.
TEM-2	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i>	TEM-1 'den bir aminoasit değişikliği vardır.
SHV-1	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i>	Sıklıkla <i>K. pneumoniae</i> 'da kromozomal genlerle kodlanır.
• OKSASİLİNAZLAR			
OXA-1	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i> 'de 2. sıklıkla bulunur.
OXA-2	Sık	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> 'da 2. sıklıkla bulunur.
OXA-3....10		<i>Enterobacteriaceae</i>	OXA-1 'e göre daha geniş bir aktiviteye sahiptirler.
• KARBENİSİLİNAZLAR			
CARB-1	Nadir	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	
CARB-2 (PSE-1)	Sık	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>P. aeruginosa</i> 'da en sık bulunur.
CARB-3...6	Nadir	<i>P. aeruginosa</i>	
• GSBL			
TEM türevi: TEM-3..29 TEM-42, 43, 47, 48, 49 50, 52, 60, 61	Nozokomiyal salgınlarda siktir.	<i>K. pneumoniae</i> , daha az sıklıkta diğer <i>Enterobacteriaceae</i>	TEM-1 ve TEM-2'den 1 ile 5 aminoasit değişikliği sonucu oluşurlar.
SHV Türevi: SHV-2-9	Nozokomiyal salgınlarda siktir.	<i>K. pneumoniae</i> , daha az sıklıkta diğer <i>Enterobacteriaceae</i>	SHV-1 'den 1 ile 3 aminoasit değişikliği sonucu oluşur.
OXA Türevi: OXA-11, OXA-14-OXA-16	Türkiye nozokomiyal izolatlar	<i>P. aeruginosa</i>	
CTX-M-1 (MEN-1)	Fransa ve Almanya klinik izolatları	<i>E. coli</i>	
PER-1	Türkiye'nin farklı hastanelerinden klinik izolatlar	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Acinetobacter</i>	
• SEFALOSPORİNAZLAR			
CEP-1	Nadir	<i>P. mirabilis</i>	
CEP-2	Nadir	<i>Achromobacter</i>	
CMY-2...5	Nadir	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Citrobacter</i> 'in kromozomal beta-laktamazına benzer.
LAT-1	Yunanistan nozokomiyal izolatlar	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Citrobacter</i> 'in kromozomal beta-laktamazına benzer
• KARBAPENEMAZLAR			
IMP-1	Nadir	<i>P. aeruginosa</i>	İmipenemi parçalayan metalloenzimlerdir.
Kaynak '60' dan uyarlanarak güncelleştirilmiştir.			

4.2.4.2.a. TEM ve SHV beta-laktamazlar

TEM-1, TEM-2 ve SHV-1, Gram olumsuz bakterilerdeki en önemli enzimler olup Bush grup 2b'de yer almaktadır (14,52,62). Bunlardan ilk kez TEM-1 ampisiline dirençli bir *E. coli*'den izole edilmiş ve enterik bakterilerin %20-60'ına yayılmış durumdadır (62). *Enterobacteriaceae* üyelerinin yanısıra *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* türlerinde de bulunmaktadır. *P. aeruginosa* 'larda ise az görülür. SHV-1 ve TEM-2 beta-laktamazlarını kodlayan plazmidler ise TEM-1 'e oranla çok daha az bulunmaktadırlar. SHV- 1 esas olarak *K. pneumoniae* suşlarında saptanmaktadır (52,62). Beta-laktamazlar arasında TEM ve SHV grubu enzimler, mikrobiyoloji laboratuvarında sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidler aracılığıyla taşınmaları nedeniyle klinik önem açısından ön planda gelmektedirler. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri benzer beta-laktamlara karşı etki gösterirler. Penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinleri etkin olarak hidrolize ettikleri halde, 3. kuşak sefalosporinlere etkisizdirler. Beta-laktam inhibitörlerine duyarlıdır. (1,62).

TEM ve SHV tipi enzim taşıyan bazı bakterilerde, bu enzimlerin aşırı üretimi söz konusu olabilir. Enzim miktarı, çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç derecesinde önemli bir belirleyicidir. Fazla miktarda salgılanan enzim bu durumda sadece penisilin türevlerine değil, daha önceden bakterinin duyarlı olduğu beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları (ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanat) ve 1 ve 2. kuşak sefalosporinlere karşı da direnç gelişmesine neden olur. Karbapenem türevleri bu türden direnç taşıyan bakterilere karşı etkilidirler (20,62).

4.2.4.2.b. Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

GSBL'ler tüm dünyada çok sayıda izole edilen beta-laktamazların majör grubunu temsil eder ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların sürekli büyüyen bir koludur. Çoğunlukla da *Enterobacteriaceae* üyeleri tarafından eksprese edilirler (11,12). Bu enzimlerin özellikle oksimino-beta-laktamlara karşı etki spektrumlarının geniş olması nedeniyle genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar olarak adlandırılmışlardır. Günümüzde 150'den fazla GSBL tanımlanmıştır (10). GSBL'lerin çoğunluğu aktif bölgelerinde serin taşır ve Ambler moleküler sınıf A'da yer alır. Bush sınıflandırmasına göre GSBL'ler, oksiminosefalosporinleri hidroliz eden ve klavulanik asit ile inhibe olan beta-laktamazlar olarak fonksiyonel grup 2be'de yer alırlar (52). GSBL'ler sefamisinlere etkili değildir. GSBL sentezleyen çoğu suş, sefoksitin ve sefotetana hassastır (10). Ancak GSBL oluşturan suşlar, dış membran porin protein kaybı nedeniyle sefamisinlere de dirençli olabilir (63).

Genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere direnç, 1980'li yılların ortasında klinik önemi olan Gram olumsuz bakterilerde ortaya çıkmıştır. Bu direncin nedeni, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır. Dar spektrumlu SHV-1 veya TEM-1 beta-laktamazlarından türev alan bu mutantlar klinik açıdan önemli problemler yaratmıştır. Bu mutantları kodlayan genlerin hareketli genetik elemanlar üzerinde yer alması nozokomiyal patojenler arasında yayılımını kolaylaştırmıştır (13,14). GSBL genlerinin plazmidlerde yer alması, beta-laktamlar yanında diğer ajanları da kapsayan çoklu direnci açıklamaktadır. Çünkü aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfonamid gibi ajanların direnç genleri de plazmidlerce taşınabilmektedir (11,47).

4.2.4.2.b.1. GSBL Tipleri

İlk GSBL, 1983 yılında Almanya'da *Klebsiella* türlerinde ortaya çıkmış ve SHV-1'e benzerliği nedeniyle SHV-2 olarak literatüre geçmiştir (50). GSBL'lerin çoğunluğu TEM ve SHV kökenlidir. Günümüzde 90'ın üzerinde TEM ve 25'in üzerinde SHV tipi GSBL vardır (10). Bu iki tip enzim, genlerinde birkaç nokta mutasyonu sonucu genişlemiş spektrum fenotipi kazanmışlardır. TEM ve SHV tipi GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinde bulunmaktadır. *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri de bu enzimleri bulundurabilir (12,47,50,51).

4.2.4.2.b.1.1. TEM Tipi GSBL'ler

TEM-1, Gram olumsuz bakterilerde en yaygın bulunan beta-laktamazdır. *E. coli*'de ampisilin direncinin %90'ından sorumlu iken (5), artan oranlarda *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'de görünen ampisilin ve penisilin direncinden sorumludur. TEM-1'in yapısında bir aminoasit değişikliğine neden olan mutasyon sonucu TEM-2, bu enzimin yapısında 2 aminoasit değişikliği ile de TEM-3 ortaya çıkar. TEM-1 ve TEM-2 etki spektrumu açısından benzer (penisilin ve türevlerine karşı aktif) birer penisilinaz iken, TEM-3 3. kuşak sefalosporinleri de parçalayabilmektedir. İlk olarak 1989 yılında bildirilen TEM-3, GSBL fenotipi gösteren ilk TEM tipi beta-laktamazdır. TEM enziminde oluşan aminoasit değişikliklerinin kombinasyonları, izoelektrik noktaları 5.2-6.5 arasında değişen, seftazidim ve seftaksim gibi spesifik oksimino-sefalosporinleri hidroliz etme yeteneğinde farklı GSBL fenotiplerini ortaya çıkarmıştır. TEM tipi enzimlerin özellikleri Tablo 5, GSBL türevlerinin amino asit değişiklikleri Tablo 6'da gösterilmiştir(10).

TEM tipi beta-laktamazlar en sık *E. coli* ve *K pneumoniae*'da bulunmakla birlikte, diğer Gram olumsuz bakterilerde de artan sıklıkta görülmektedir. TEM tipi beta-laktamazlar *E. aerogenes*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* ve *Salmonella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* türlerinde rapor edilmiştir (64-71). TEM-24 ve TEM-42 *P. aeruginosa* kökenlerinde saptanmıştır (72,73).

Tablo 5. TEM tipi beta-laktamazların özellikleri

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

Tablo 6. TEM GSBL türevlerinde amino asit değişiklikleri

TEM-1	TEM GSBL türevleri
Leu 21	Phe TEM-4, 9, 25, 48, 49, 53, 63
Gln 39	Lys TEM-3, 7, 8, 11, 13, 16, 18, 21, 22, 42, 46, 56, 60, 61, 66, 72
Ala 42	Val TEM-42
Leu 51	Pro TEM-60
Gly 92	Asp TEM-57, TEM-66
Glu 104	Lys TEM-3, 4, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 24, 26, 43, 46, 50*, 52, 56, 60, 63, 66
His 153	Arg TEM-21, TEM-56
Arg 164	Ser TEM-5, 7, 8, 9, 10, 12, 22, 25, 26, 46, 53, 60, 63 His TEM-6, 11, 16, 27, 28, 29, 43, 61
Met 182	Thr TEM-20, 43, 52, 63, 72
Gly 218	Glu TEM-55
Ala 237	Gly TEM-22 Thr TEM-5, TEM-24
Gly 238	Ser TEM-3, 4, 8, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 42, 47, 48, 49, 52, 66, 68*, 72
Glu 240	Lys TEM-5, 10, 24, 27, 28, 42, 46, 47, 48, 49, 61, 68*, 72 Ser TEM-50
Arg 244	Leu TEM-54 Ser TEM-58
Thr 265	Met TEM-4, 9, 13, 25, 27, 42, 47, 48, 68*
Ser 268	Gly TEM-49

*, TEM-50 ve TEM-68 hem GSBL hem de İRT (inhibitör rezistan TEM) özelliği taşıyan fenotiplerdir.

4.2.4.2.b.1.2. SHV Tipi GSBL'ler

SHV-1 beta-laktamaz en sık *K. pneumoniae*'da bulunarak, bu türlerde plazmid aracılı ampisilin direncinin %20'ye yakınından sorumludur. TEM tipi beta-laktamazlara benzemeyen SHV-l'in az sayıda türevi bulunmaktadır. SHV varyantları yapısal genler içinde birkaç pozisyon değişikliği ile oluşur. GSBL fenotipi bulunan SHV türevlerinde, SHV-1'e göre 238. pozisyonda glisin→serin, 240. pozisyonda glutamin→lizin değişimi vardır. Bu değişiklikler TEM tip GSBL'lere bezelik göstermektedir. Sonuçta 238. pozisyondaki serin rezidüsü seftazidime, 240. pozisyondaki lizin rezidüsü ise sefotaksime karşı hidroliz etkinliği açısından önemlidir (10).

SHV türevlerinin büyük çoğunluğu GSBL özelliindedir. SHV-10 ise inhibitör dirençli fenotip olarak rapor edilmiştir (74).

SHV tipi GSBL'nin çoğu *K. pneumoniae* kökenlerinde bulunmuştur. Ancak bu enzimler *E. coli* ve diğer bazı enterik bakterilerde ve *P. aeruginosa*'da da saptanmıştır (14,21,75-77). SHV tipi GSBL'lerin özellikleri Tablo 7, amino asit değişiklikleri Tablo 8'de gösterilmiştir (10).

Tablo 7. SHV tipi beta-laktamazların özellikleri

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

Tablo 8. SHV GSBL türevlerinde amino asit değişiklikleri

SHV-1	SHV GSBL türevleri
Ile 8	Phe SHV-7, SHV-14, SHV- 8
Leu 35	Gln SHV-2a, SHV-12, SHV-13, SHV-25
Arg 43	Ser SHV-7, SHV-14
Leu 51	Pro SHV-60
Leu 122	Phe SHV-21
Met 129	Val SHV-25
Ser 130	Gly SHV-10
Asn 158	Lys SHV-22
Leu 173	Phe SHV-19, SHV-20
Asp 179	Ala SHV-6 Asn SHV-8 Gly SHV-24
Ala 187	Thr SHV-26
Arg 205	Leu SHV-3, SHV-4
Gly 238	Ala SHV-13, SHV-18 Ser SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV- 5, SHV-7, SHV-10, SHV-12, SHV-20, SHV-21, SHV-22
Glu 240	Lys SHV-4, SHV-5, SHV-7, SHV-10, SHV-12, SHV-18, SHV-20

4.2.4.2.b.1.3. İnhibitor Dirençli Beta-Laktamazlar

İnhibitör dirençli beta-laktamazlar GSBL olmamasına rağmen, klasik TEM veya SHV tipi enzimlerin türevleri olduğu için çoğu zaman bu grupta tartışılmaktadır. 1990'lı yılların başlarında klavulanik aside dirençli beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır. Bu enzimler TEM-1 veya TEM-2 türevidir. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM türevi olduğu için İnhibitörlere rezistan TEM (IRT) olarak adlandırılırlar. En az 19 farklı IRT beta-laktamazu vardır. (10).

Moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre Bush, Jacoby ve Mederios tarafından yapılan son sınıflandırmada Grup 2br'de yer almaktadırlar. Gerek TEM-1 ve TEM-2 gerekse bunların genişlemiş spektrumlu türevleri klavulanik asite duyarlıdır. Ancak ana enzimdeki 69, 244 ve 276. pozisyonlardaki değişiklikler bu enzimlerden inhibitörlere dirençli mutantların gelişmesine yol açmıştır (78). IRT beta-laktamazları esas olarak *E. coli*'nin klinik izolatları yanısıra *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *C. freundii* ve *E. cloacae* izolatlarında da bulunur (79-81).

İnhibitör dirençli varyantlar klavulanik asit ve sulbaktam ile inhibisyona dirençli olmasına ve amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat ve sulbaktam-ampisilin gibi inhibitör kombinasyonlarına klinik olarak direnç göstermesine karşın, tazobaktam ve böylece piperasilin-tazobaktam inhibisyonuna duyarlı kalır. Günümüze kadar bu enzimler öncü olarak Fransa ve birkaç Avrupa ülkesinden rapor edilmiştir (82). Fransa'da *E. coli* izolatları ile yapılan yeni bir çalışmada IRT beta-laktamazu varlığı %41 olarak bulunmuştur (83).

TEM enziminin yapısal genindeki birkaç nokta mutasyonuna bağlı amino asit değişikliği inhibitör dirençli fenotipin oluşmasını sağlar (82,84). Sirot ve ark. (85) bir *E. coli* klinik izolatında GSBL özelliği olan IRT enzimi saptamışlardır. TEM varyantlarına ek olarak SHV-1'in inhibitör dirençli türevi (SHV-10) de bilinmektedir (74).

Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç çeşitli mekanizmalarla gelişebilmektedir. Bu direnç şekli, OXA-1, kromozomal/plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar gibi inhibitörlere kısmen veya tümüyle dayanıklı enzimlerin üretimine ya da OmpF/OmpC mutasyonlarına bağlı olabilir. Bunların yanısıra, TEM-1 enzim aktivitesinin yüksek olması ve fazla miktarda üretimi de klavulanik asit direncine neden olabilmektedir. Bu nedenlerle inhibitörlere dirençli

enzimler, amoksisilin/klavulanat kombinasyonlarına ortada veya dirençli gözükten *Enterobacteriaceae* izolatlarında beta-laktamazları kodlayan bla_{TEM-1a,b} ve bla_{TEM2} genlerinin polimeraz zincir tabanlı yöntemlerle çoğaltılması ve dizgi analizlerinin yapılması ile tanımlanabilmektedir (78).

4.2.4.2.b.1.4. CTX-M Tipi GSBL'ler

Son yıllarda özellikle sefotaksimi hidrolizleyen CTX-M olarak adlandırılan plazmid aracılı yeni bir GSBL ailesi tanımlanmıştır. Filogenetik çalışmalar CTX-M-1 (MEN-1), CTX-M-3'den oluşan CTX-M-1 tip, CTX-M-2-7'den oluşan CTX-M-2 tip, TOHÖ-1,2 ve CTX-M-8 gibi bu ailenin dört üyesi olduğunu göstermektedir. CTX-M tipi beta-laktamazların sefalotin veya sefaloridini benzilpenisilinden ve sefotaksimi de seftazidimden daha fazla hidrolize edebildiği gösterilmiştir. Bu enzim, sefotaksimi hızlı hidrolizlemesine ek olarak sulbaktam ve klavulanattan daha çok beta-laktamaz inhibitörü tazobaktam ile daha iyi inhibe edilir (10,47). Bu enzimler TEM ve SHV enzimleri ile yaklaşık %40 benzerlik gösterir. CTX-M grubunun özellikle bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin kromozomal Sınıf A enzimlerine %73-77 homoloji gösterdiği bildirilmiştir (68,86).

CTX-M grubu enzimlerin sayısı hızla artmaktadır. Bu enzimler, dünyanın bir çok yerinden (Doğu avrupa, Güney Amerika Japonya, Çin) rapor edilmiş ve *Enterobacteriaceae* izolatlarında saptanmışlardır (86, 87-90). Ülkemizde de *E. coli* suşlarında CTX-M-3 (90A) ve bir *Shigella sonnei* suşunda CTX-M tipi (90B) GSBL varlığı bildirilmiştir.

4.2.4.2.b.1.5. OXA Tipi GSBL'ler

OXA tipi enzimler GSBL'lerin gittikçe çoğalan diğer bir koludur. Fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almalarıyla TEM ve SHV enzimlerinden ayrılırlar. Ampisilin ve sefalotine dirençlidirler. Oksasiline karşı yüksek hidrolitik etkileri vardır. Klavulanik asitten az etkilenirler (52).

OXA-1 den OXA-10'a kadar olan OXA enzimleri dar spektrumlu enzimlerdir. Son yıllarda bu enzimlerin de genişlemiş spektrumlu mutantlarının çıktığı saptanmıştır. Bunlardan ilki OXA-11 enzimidir ve Hacettepe üniversitesi hastanesinde yatan bir hastadan izole edilen bir *Pseudomonas* izolatında bulunmuştur (40). Daha sonra dünyada ilk kez OXA-14, OXA-15, OXA-16 ve OXA-17 beta-laktamazları Hacettepe'de izole edilen farklı *P. aeruginosa* kökenlerinde tanımlanmıştır. OXA-15 enziminin OXA-2'den,

diğerlerinin ise OXA-10'dan türediği saptanmıştır. OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır. Bu enzimlerin önemi, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olmaları ve hastane enfeksiyonlarından soyutlanan kökenlerde saptanmalarıdır (40). OXA tipi GSBL'ler esas olarak *P. aeruginosa*'da bulunmaktadır (76,91-94).

4.2.4.2.b.1.6. Diğer GSBL'ler

Bilinen GSBL aileleriyle ilişkisi olmayan PER-1 enzimi ilk olarak Fransa'da bir Türk hastadan soyutlanan *P. aeruginosa*'da saptanmıştır (95). Daha sonra ülkemizde Vahaboğlu ve ark. (96-98) tarafından *S. typhimurium*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* kökenlerinde gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde seftazidim dirençli *A. baumannii* suşlarının %60'ında PER-1 enzimine rastlanılmıştır (98). PER-1'e %86 homoloji gösteren PER-2, *S. typhimurium*'da Arjantin'den bildirilmiştir (99). Bunlardan başka; VEB-1 ilk olarak Vietnam'da *E. coli*'de (100), yine *E. coli*'de TLA-1 Meksika'da (101) bulunmuştur. Diğer enzimler CME-1, SFO-1 ve GES-1 dir (10).

PER-1, VEB-1, CME-1 ve TLA-1 %40-50 benzerlik gösterirler. Bu enzimler oksimino-beta-laktamlara dirençlidir. Seftazidim ve aztreonamı daha etkin parçalarlar. *Bacteroides* spp. kromozomal sefalosporinazlarına benzerlikleri nedeniyle bu cinsden köken almış olabilecekleri belirtilmektedir.(10).

4.2.4.2.b.2 GSBL Araştırma Yöntemleri

4.2.4.2.b.2.1. Fenotipik Yöntemler

GSBL oluşturan *Enterobacteriaceae*'ların artan prevalansı, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığını doğru olarak belirleyecek laboratuvar testlerine gereği arttırmaktadır. GSBL'lerin çoğu bir veya daha fazla oksimino-beta-laktama dirençli olmasına karşın MİK değerleri her zaman NCCLS kriterlerine göre dirençli kabul edilebilecek düzeye ulaşmaz (15,17). GSBL'yi araştırmak için kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgülüğü test edilen sefalosporinler ile değişebilmektedir. Bazı araştırmacılar sefpodoksimin diğer sefalosporinlere göre GSBL saptanmasında daha etkin olduğunu belirtse de (102,103) son çalışmalarda yalancı pozitifliklere neden olduğu vurgulanmıştır (10). *E. coli* ve *K. pneumoniae*

kökenlerinde bir GSBL'nin varlığını güvenli olarak araştırmak için MİK veya disk difüzyon testlerinin herhangi birinin tek başına uygulanmasının başarısız sonuçlar verdiği belirtilmiştir (103,104). Dünya Sağlık örgütü destekli 130 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada laboratuvarlardan sadece 2'si GSBL (+) örneği doğru rapor etmiştir (105).

GSBL tanısında geleneksel duyarlılık testlerindeki duyarlılık ve özgüllük problemi nedeniyle klinik izolatlarda doğru tanı sağlayacak çok sayıda yöntem önerilmiştir.

NCCLS, genişlemiş spektrumlu safalosporinlerden birinin 1 µg/ml'sini içeren sıvı besiyerinde üremenin test edilmesinin bir ön tarama testi olmasını, pozitif sonuçların kuşkulu GSBL varlığı olarak rapor edilmesini ve doğrulama için ileri inceleme yapılmasını, bunun yanında üçüncü kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin MİK değeri ≥ 2 µg/ml olarak saptandığında ya da seftazidim ve sefpodoksim inhibisyon zon çaplarının ≤ 22 mm; aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının ≤ 27 mm; seftriakson zon çapının ≤ 25 mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmasını önermektedir (17). Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır.

NCCLS'e göre; Mikrodilüsyon testinde 4 µg/ml klavulanik asit eklenmesiyle genişlemiş spektrumlu beta-laktam ajanların MİK değerlerinde ≥ 8 kat azalma saptanması veya klavulanik asit (10 µg) içeren genişlemiş spektrumlu beta-laktam disklerinin zon çaplarında ≥ 5 mm genişleme saptanması GSBL varlığını gösterir (17).

Çift disk sinerji (ÇDS) Testi, Jarlier ve ark.(7) tarafından geliştirilen ve GSBL'nin belirlenmesinde en yaygın kullanılan testlerden biridir. Bu testte mikroorganizma Mueller Hinton Agar plağı yüzeyine yayılır, bir amoksisilin/klavulanik asit diski plağın merkezine, sefotaksim, seftazidim, aztreonam ve sefepim diskleri amoksisilin/klavulanat diskinin 30 mm uzağına (merkezden merkeze) yerleştirilerek 35°C'de 18 saat inkübasyona bırakılır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktam disklerinden herhangi birinin inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanat diskine doğru genişlemesi pozitif sonuç kabul edilmektedir.

Bu test GSBL'yi araştırmak için güvenilir olarak benimsenmekle birlikte test duyarlılığının diskler arasındaki mesafenin 20 mm'ye indirilmesi ile artacağı gösterilmiştir (106). Alternatif bir yöntem, Mueller Hinton agara klavulanat (4 µg/mL) eklenerek bir ya da daha çok geniş spektrumlu sefalosporinin inhibisyon zonundaki genişlemenin incelenmesidir (107).

Benzer bir test Jacoby ve ark. (104) tarafından dizayn edilmiştir. Oksimino-beta-laktam diskinde 20 µg sulbaktam ilave edilmiş, sulbaktam içeren disk zonunda 5 mm'lik artış pozitif olarak değerlendirilmiştir. Son yıllarda bu mekanizmayla çalışan ticari kombine disk yöntemleri (Oxoid "Combination Discs" , Mast "MAST DD") kullanıma sunulmuştur. Oxoid kombine diskleri; sefpodoksım (10 µg) ve sefpodoksım+klavulanat (10 µg+1 µg)'tan oluşurken Mast diskleri; seftazidim (30µg), sefotaksım (30µg), seftazidim+klavulanat (30 µg+10 µg) ve sefotaksım+klavulanat (30 µg+10 µg) kombinasyonundan oluşur (59).

Üç Boyutlu Test, GSBL varlığını inceleyen diğer bir yöntemdir. Bu testde de disk difüzyon yöntemi esas alınır, disk difüzyon testinden teknik olarak farkı ek olarak petri kutusunun merkezine yakın tarafta ve antibiyotik disklerinin 3 mm uzağından besiyerinin dairesel bir şekilde kesilmesidir. Eğer yarığa ekilen suş GSBL üretiyorsa antibiyotiklere ait inhibisyon zonunda yarık hizasında bozulma ya da kesilme görülecektir. Bu test direkt ve indirekt olarak uygulanabilir. Direkt yöntemde 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde hazırlanan test edilecek bakteri süspansiyonu 4 mm kalınlığında hazırlanan Mueller-Hinton Agarın yüzeyine sürülür. Kesilen yarığın içerisine ise yaklaşık olarak 10^9 - 10^{10} bakteri yoğunluğuna eşit olacak şekilde hazırlanan aynı bakterinin süspansiyonu inoküle edilir. İndirekt yöntemde ise besiyerinin yüzeyine kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bilinen bir suş sürülür. Yarığın içerisine de yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan test edilecek suş inoküle edilir. Yöntemde seftriakson, sefotaksım, seftazidim ve aztreonam diskleri kullanılır, besiyeri 37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılır ve sonuçlar çıplak gözle değerlendirilir (19). Üç boyutlu yöntem duyarlı olmasına rağmen diğer yöntemler göre teknik olarak uygulaması zordur.

"E-test ESBL" stripleri (AB Biodisk), ticari GSBL arama testlerinden biridir. E-test GSBL striplerinin bir ucu seftazidim diğer ucu ise seftazidim/klavulanat içermektedir. Seftazidim/klavulanik asit MİK değerinin, seftazidim MİK değerine göre ≥ 8 kat azalma göstermesi GSBL (+) olarak yorumlanır. Duyarlılık konusunda farklı görüşler olması yanında testi yorumlamak da her zaman kolay değildir (18,108).

"VITEK ESBL" (BioMerieux Vitek Inc., St. Lois, Missoiri); Otomatik mikrobiyal duyarlılık test sistemi olan VITEK'in GSBL testidir. Tek başına seftazidim veya sefotaksımın klavulanat (4 µg/ml) ile kombinasyonunu içeren kuyucuklardan oluşan bir sistemdir. Tek başına ilaç içeren gözlerle karşılaştırıldığında klavulanat içeren kuyucuklarda üreme azalması, GSBL varlığını gösterir. Bu sistemin de bakteri türüne göre duyarlılığında problem olduğu vurgulanmaktadır (109,110).

Yukarıda tanımlanan yöntemlerden hiç birisi GSBL üreten tüm suşlarda doğru saptama yapamamaktadır. Vercauteren ve ark.(108) seftazidimi kullanan E-test GSBL'nin GSBL'lerin %81'ini saptarken, üç boyutlu yöntem %91, ÇDS ise %97'sini saptamıştır. MAST DD, E-test GSBL ve ÇDS testlerini birlikte inceleyen M'Zali ve ark.(111) GSBL varlığını E-test ve MASST DD ile %93, ÇDS testini ise daha başarılı bulmuşlardır. Tzelepi ve ark.(112) VITEK GSBL'nin enterobakter suşlarında başarısız olduğunu göstermiştir.

Laboratuvarlar GSBL saptanmasında hata yapabilmektedirler. 38 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada laboratuvarların sadece %18'i GSBL'leri doğru saptamıştır (110). Avrupa'da yapılan bir başka çalışmada GSBL üreten suşların %37'si genişlemiş spektrumlu safalosporinlere duyarlı rapor edilmiştir (113).

ÇDS ve NCCLS sıvı dilüsyon doğrulama testi en kolay uygulanabilen ve en ekonomik yöntemler olarak görülmektedir. Fenotip temeline dayalı doğrulama yöntemlerden hiç birisi Gram olumsuz klinik izolatlarda GSBL varlığını doğru saptamada %100 duyarlı ve özgül değildir. Günümüzde klinik izolatlarda GSBL'nin doğru tanımlanması gerekliliği artık iyice anlaşılmıştır (27).

Yalancı pozitiflik veya negatiflik GSBL fenotipik tarama testleri için önemli bir sorundur. TEM-1 ve SHV-1'in aşırı sentezinin MİK değerlerini GSBL pozitiflik sınırına çıkarabildiği bilinmektedir (20,23,24). Beta-laktamaz yapımına dış membran protein değişikliğinin eşlik etmesi de yalancı pozitifliğe neden olmaktadır (21,25). GSBL varlığı AmpC enzimi ile maskelenerek yalancı negatifliklere neden olabilir (22,26). Beta-laktamaz inhibitörlerinin az da olsa AmpC'yi indüklemeye olasılığı olması, duyarlılık sınırlarını değiştirebilir. AmpC üreten suşlarla GSBL üreten suşların ayrımı için ÇDS testinde sefoksitin ve sefepim diskinin kullanılması yararlı olabilir (114).

4.2.4.2.b.2.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

Yukarıda tanımlanan testler sadece GSBL varlığını belirlemeye yönelik testlerdir. GSBL tipinin klinik izolatlarda belirlenmesi işi karmaşıktır. GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın saptanması varolan GSBL'leri göstermek için yeterli idi. Ancak sayıları 90'ın üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan, bu test daha uzun süre yararlı olamamıştır (10).

Spesifik GSBL tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gerek vardır. En sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntem beta-laktamaz genlerine spesifik oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı PCR'dir. Bu yöntemle ancak enzimin bağlı olduğu aile saptanabilir, enzim varyantları arasında ayırım yapılamaz. DNA dizi analizi dışında GSBL'lerin ayırımını yapan çeşitli yöntemler tanımlanmıştır (10).

İlk moleküler yöntem oligotiplendirmedi. bla_{TEM} genleri için 6 noktada mutasyonları saptamaya yönelik oligonükleotid problemler kullanılır (28). TEM enzimleri için diğer bir uygulama PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)'dir. Bu yöntemde TEM PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesim ürünleri elektroforez ile görüntülenir (29).

SHV türevleri için de farklı yöntemler uygulanmaktadır. En basit olanı Nüesch-Indebien ve ark. (30) tarafından önerilen SHV PCR ürününün NheI restriksiyon enzimi ile kesilmesidir. NheI enzimi SHV tipi GSBL genlerinde ortaya çıkan, 238. pozisyondaki glisin→serin değişimine neden olan G→A nükleotid değişikliğine özgüdür. Dolayısıyla SHV tipi GSBL'ler SHV-1'den ayırt edilebilmektedir. Ancak GSBL tipi bu yöntemle belirlenemez. 238. amino asit pozisyonunda değişikliğe uğramayan yeni enzimlerin bulunmasıyla bu yöntem etkisiz kalmıştır (21).

PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) tekniği hem SHV tipi (32-33) hem de TEM tipi (115) GSBL'ler için kullanılmaktadır. Bu yöntem gen içinde spesifik bölgelerde tek baz mutasyonlarını belirlemek için kullanılır. OXA enzimleri için de OXA tipi GSBL'leri diğerlerinden ayırmayı sağlayan PCR-RFLP'i yöntemi geliştirilmiştir (34).

DNA dizi analizi TEM ve SHV genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen tek yöntemdir. Bu analiz spesifik beta-laktamaz genlerini saptamada standart olma özelliğini korumaktadır (35,116)

4.2.4.2.b.3. GSBL'lerin Tıbbi Önemi

GSBL oluşturan mikroorganizmalarla infekte olan hastalar genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler ile sağaltımın başarısızlığı açısından yüksek risk altındadır. GSBL varlığı doğrulanan izolatlar, NCCLS kriterlerine göre duyarlılık test sonucuna bakılmaksızın bütün geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli rapor edilmelidir (17,59).

GSBL'ler sefalosporinleri hidrolize etmelerine rağmen, GSBL üreten bakteriler in vitro testlerde tüm sefalosporinlere dirençli bulunmazlar. Bunun sonucunda da antimikrobiyal duyarlılık yanlış değerlendirilerek genişlemiş spektrumlu bir beta-laktam ile tedavi başlanabilmekte ve özellikle bakteriyemi gibi ciddi infeksiyonlarda fatal olabilen tedavi başarısızlıkları görülebilmektedir (116A).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının bir ya da daha çok yöntem ile GSBL araştırması önemlidir. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının duyarlılıkları da rapor edilmelidir. Bu inhibitörlü kombinasyonların, GSBL üreten mikroorganizmalar tarafından oluşturulan infeksiyonların sağaltımında iyi birer alternatif olduğuna ilişkin çalışmalar vardır (117,118).

GSBL'lerin doğru saptanması iki açıdan çok önemlidir; birincisi, GSBL'lerin tüm dünyada hızla artması, ikincisi ise GSBL üreten bakterilerin, bazı genişlemiş spektrumlu beta-laktam ajanlara duyarlı gibi görünseler de MİK değerlerinde görülen inokulum etkisidir. İnokulum etkisi, bakteri sayısının yüksek olmasına paralel olarak direnç düzeyinin de artmasını tanımlayan bir ifadedir. Duyarlılık testlerinde önerilen inokulum miktarı 10^5 ten 10^7 bakteri/ml'ye çıkarıldığında sefalosporinlerin MİK değerlerinde dramatik bir artış olur. Önerilen inokulum miktarında MİK değerleri düşük olur, infeksiyon yerinde inokulum sayısının artması sağaltımda başarısızlığa neden olabilir (4,13).

Oksimino beta-laktamların klinik kullanıma girmesi ve yaygın kullanımı sonucunda *K. pneumoniae*, *E. coli* ve diğer birkaç türde GSBL'lerin ortaya çıktığı ve bunların plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarıldığı bilinmektedir (13). Bu beta-laktam ajanların yaygın kullanımı sonucunda 1995 yılından günümüze kadar GSBL sayısı hızla artarak 150'yi geçmiştir (4).

Hastanelerde seftazidim ve sefotaksim gibi 3. kuşak sefalosporinlerin ampirik tedavide kullanımının kısıtlanması genellikle GSBL üreten suş prevalansında düşme ile sonlanmaktadır. GSBL prevalansı özellikle genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin klinik tedaviye girme zamanı ve yaygın kullanımı ile ilişkili olduğu için GSBL üreten suş sayısı ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye hatta aynı hastanedeki servisler arasında değişmektedir. Özellikle yatak sayısı çok olan eğitim hastanelerinde GSBL üreten suş prevalansı daha yüksektir. Ayrıca hastaya ait alta yatan hastalık, düşük doğum ağırlığı, prematürite, üriner/santral-venöz/arteryel kateter varlığı, entübasyon, önceden sefalosporin kullanımı gibi faktörler GSBL üreten suşlarla kolonizasyon/infeksiyon riskini arttırmaktadır. GSBL'si bulunan ve bulunmayan bakterilerle gelişen infeksiyonlar, mortalite, morbidite ve sağlık giderleri açısından karşılaştırıldığında, ilk tedavi olarak karbapenemlerin kullanıldığı hastalar hariç, GSBL üreten suşlarla gelişen infeksiyonlarda mortalitenin daha yüksek, yatış süresinin daha uzun ve sağlık giderlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (3). *E.coli* ve *K.pneumoniae* ile gelişen bakteriyemilerde ESBL sentezinin fataliteyi önemli derecede arttırdığı saptanmıştır (119).

Yakın zamanda bildirilen salgınlarda çoklu beta-laktamazlara sahip mikroorganizmaların rol aldığı görülmektedir (75,120). Örneğin, Yan ve ark.(121) bir *K. pneumoniae* klinik izolatında tek bir plazmid tarafından kodlanan SHV-12, TEM-1 ve bir metallo-beta-laktamaz varlığı rapor etmişlerdir. Bu tür kombinasyonlara bağlı olarak imipenem dahil tüm beta-laktamlara direnç görülebilir (22)

4.2.4.2.b.4. Epidemiyoloji

GSBL'ler tüm dünyada yatan hastalarda önemli bir problemdir. Amerika'da *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL pozitifliği %0-25'dir (10). Avrupa'da ülkeler arasında farklılık vardır. Fransa'da hastane kökenli *Klebsiella*'lardaki GSBL oranı 1985 yılında % 1, 1989'da % 11 olup günümüzde %40'a yükselmiştir (10,40). Günümüzde Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella* türlerinin %20-25'inde GSBL saptanmaktadır. Türkiye'de 1998 yılında 554 hastane izolatu gram negatif bakteri ile yapılan çok merkezli bir çalışmada belirlenen en yüksek GSBL oranları *Klebsiella* spp.'de %86, *E. coli*'de %27 olmuştur. Son çalışmalara göre Türkiye Avrupa ülkeleri içinde en yüksek GSBL sıklığına sahip ilk üç ülke arasındadır (40).

Ülkemizde GSBL sıklığı konulu araştırma sonuçlarında farklılıklar olmakla birlikte GSBL üreten bakterilerin yıllar içerisinde artış gösterdiği bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yapılan çalışmalarda 1994-1996 yılları arasında *K.pneumoniae* kökenlerinde GSBL varlığı %14,9 iken, bu oranın 1997-1999 yılları arasında %29'a yükseldiği bildirilmiştir (54). Ülkemizde GSBL sıklığının araştırıldığı bazı çalışmalar Tablo 8'de verilmiştir.

Bazı GSBL tipleri coğrafik farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, TEM-10 yıllardır Amerika'da salgınlar yapmış (10), oysa yakın zamanda Avrupa'dan rapor edilmiştir (122). Bezer olarak TEM-3 Fransa'da (47), TEM-47 Polonya'da (123), TEM-52, SHV-12 ve SHV-2a Kore'de bulunmaktadır (124,125). SHV-5 ise bir çok ülkede yaygındır. Türkiye dahil dünyada en yaygın olan enzim ise SHV-2'dir (14,40).

Tablo 9. Türkiyede hastane kökenli *E. coli* ve *Klebsiella* türlerinde GSBL sıklığı

Kaynak	Yıl	Bakteri	GSBL sıklığı(%)
Abacioğlu (126)	1995	<i>K. pneumoniae</i>	62.5
Gülay (36)	1996	<i>K. pneumoniae</i>	88.6
Eskitürk (127)	1996	<i>Klebsiella</i> türleri	52
Kaygusuz (128)	1997	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	70 6
Gültekin (37)	1999	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	54 21
Ülkar (38)	1999	<i>Klebsiella</i> türleri <i>E. coli</i>	32.5 11.5
Gülay (39)	2000	<i>K. pneumoniae</i>	84
Gökahmetoğlu (129)	2001	<i>Klebsiella</i> türleri <i>E. coli</i>	58 13
Löker (130)	2001	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	42.6 3.1
Aktaş (131)	2001	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	58.3 19.2
Özkan (140)	2002	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i>	66 39

4.2.4.2.c. Plazmid Kontrolündeki AmpC Beta-Laktamazlar

Kromozom kontrolunda olan ve yukarıdaki bölümlerde söz edilen AmpC enzimlerinin 1989 yılından itibaren plazmid kontrolunda olan türleri bulunmuş ve sefamisinlere karşı direnç aktarılabılır hale gelmiştir. Bu enzimler indüklenebilen AmpC sentezlediği bilinen *Enterobacter* ve *Citrobacter* dışında *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, ve *P. mirabilis* gibi bakterilerde de gözlenmektedir. Bu enzimlerin hepsi köken aldıkları kromozomal enzimlerle aynı substrat profiline sahiptirler. Ancak plazmid kaynaklı AmpC enzimlerinin kromozomal olanlardan farkı indüklenemez olmalarıdır (114,57).

Tüm beta-laktamazlarda olduğu gibi bunlarda da bir isim kargaşası yaşanmış ve dirençli oldukları ilaca göre; CMY, FOX, LAT, MOX gibi isimler yanında AmpC tipi (ACT), Ambler sınıf C (ACC), araştırma yerin göre (MIR-1) veya (DHA) ve hasta adına göre (BIL-1) gibi isimler almışlardır. Enzimler arasında farklılıklar olabilmekle birlikte genel olarak bu enzimler de penisilinlere ve sefalosporinlere direnç oluşturmaktadır ve beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler. Bu gruptaki enzimler karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç oluşturmamakla birlikte permeabilitesi azalmış olan

bakterilerde bu grup antibiyotiklere karşı da direnç oluşmaktadır. Plazmid kontrolunda AmpC beta-laktamaz sentezleyen mikroorganizmaların büyük çoğunluğu yoğun bakımda yatan, beta-laktam tedavisi almış, altta yatan hastalığı olan veya immünbaskılanmış kişilerden izole edilmiş ve izolatların çoğunda bu enzimin yanında başka bir beta-laktamazın, hatta GSBL'nin de bulunduğu gösterilmiştir (57).

4.2.4.2.d. Karbapenemazlar

Meropenem ve/veya imipenemi hidrolizleyen beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Kazanılmış dirence dahil olan karbapenemazlar, Ambler moleküler sınıflamasında A, B ve D grubundadırlar. Sınıf A klavulanik asit ile inhibe edilen karbapenemazlardır ve nadirdir. Kromozomal olarak (*E. cloacae*, *S. marcescens*) veya plazmidler (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) ile kodlanmaktadır. Sınıf B karbapenemazlar klinik olarak en önemli karbapenemazlardır (132). IMP ve VIM serisi olanlar metalloenzimlerdir. Dünyada yaygın olmakla birlikte en sık olarak Japonya ve Avrupa'dan bildirilmiştir (4). Genleri plazmid ya da integron üzerinde bulunan metalloenzimler monobaktamlar hariç bütün beta-laktamları hidrolize ederler. Sınıf D karbapenemazlar artan sıklıkta *A. baumannii*'de tespit edilmiştir. Imipenem ve meropenem duyarlılığında kısmi bir azalma söz konusudur (132).

Metallo-beta-laktamazlar aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir. Beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken EDTA ile inhibe olurlar. Çinko iyonuna bağlanarak enzimi inaktive eden EDTA, 2-merkaptopropionik asit gibi bileşikler kullanılarak çift disk sinerji testine benzer bir yöntemle tanımlanabilirler (133).

Başlangıçta kromozom kontrolunda olan bu enzimlerin son yıllarda plazmid kökenli olanlarının ortaya çıkması karbapenemlerin geleceği konusunda endişe doğurmuştur. Özellikle Avrupa ülkelerinde IMP ve VIM ailesi üyeleri giderek artmaktadır (132). Ülkemizde çeşitli *P. aeruginosa* izolatlarında bu tür enzimlerin bulunduğu saptanmıştır ancak henüz bunların tipleri tanımlanmamıştır Bu konudaki araştırmaların sürdüğü belirtilmektedir. Karbapenem antibiyotiklere karşı direnç oluşturan bu enzimlerin artışı ileride beta-laktamazlara karşı etkili olabilen karbapenem grubu antibiyotiklerin de etkisiz kalacağını düşündürmektedir (40).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde, Nisan-Aralık 2000 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden soyutlanan *Enterobacteriaceae* üyesi olan ardışık 250 bakteri toplandı.

Bakterilerin tanımlanması geleneksel bakteriyolojik testlerle yapıldı ve belirsiz olan izolatlar için otomatize identifikasyon sistemi, VITEK (BioMerieux) kullanıldı. Aynı hastadan gelen birden fazla örnekten izole edilen benzer suşlardan ilki dışındakiler elendi. Rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile ampisilin dirençli olan 167 izolat potansiyel beta-laktamaz üreticileri olarak seçildi ve tez kapsamına alındı. Seçilen izolatlar 1,5 mL'lik Eppendorf tüpleri içinde, bir gecelik sıvı besiyeri kültürüne %1 gliserin eklenerek çalışma zamanına dek -70 °C'de stoklandı.

5.1.2. Ayraçlar

1- 1 M Tris-Cl (pH= 8.0)

Trisma base (Sigma T8524)	46.5 g
Trisma HCl	18.3 g
Distile su	500 ml'ye tamamlandı

2- EDTA (ethylenediaminetetraacetate) (Sigma E5134)

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

EDTA pH=8.0 'da erir. 1-2 g NaOH pelleti ile istenen pH elde edildi ve otoklavlandı.

3- TE (10:0.1) buffer: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH=8,0

4- TE (10:1) buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=8,0

5- 2N NaOH

NaOH 8 g
dH₂O 100 mL'ye tamamlandı.

6- %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (Sigma L 3771)

SDS 1 g
dH₂O 10 ml Filtre ile steril edildi.

7- Fenol (10 mM Tris HCl ile satüre edilmiş, pH=8.0) (Sigma P4557)

8- Kloroform : isoamilalkol

Kloroform (Sigma C2432) 49 kısım
İsoamilalkol (Sigma I9392) 1 kısım
Her çalışmada taze ve koyu renkli şişede hazırlandı.

9- Fenol/kloroform/izoamilalkol(25:24:1):

50 mL Fenol
48 mL kloroform
2 mL izoamilalkol
Her çalışmada taze ve koyu renkli şişede hazırlandı.

10- % 95 Etanol

11- %70 Etanol

%95 EtOH 74 ml
Distile su 26 ml

12- Sodyum asetat 3 M (pH=5.2) (Sigma S2889)

NaOAc (anhidro) 24.61 g
ya da NaOAc.3H₂O 39.01 g
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.
pH glasiyel asetik asit eklenerek ayarlandı. Otoklavlandı.

13- TBE (5X)

Tris base (Sigma T8524)	54 g
Boric asid (Sigma B6768)	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml
Distile su	1000 ml' ye tamamlandı.
Otoklavlandı. Oda ısısında 1 ay stabildir.	

14- Agaroz (Sigma A9539)**15- Etidyum bromid (1000X, 5 mg/ ml) (Sigma E8751)**

Etidyum bromid	0.5 g
Distile su	100 ml
Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı. + 4°C de saklandı.	

16- Jel yükleme tamponu (Tip III, 6X)

%0.25 bromfenol mavisi (Sigma B5525) (%10 stoktan)	0.75 ml
%0.25 xylene siyanol FF (Sigma X4126) (%5 stoktan)	1.5 ml
%30 gliserol (su içindeki karışımı)	9 ml
Distile su	18.75 ml

17- Nitrosefin (Oxoid SR112C), 1 mg

Kendi çözücüsü içinde (Fosfat tamponu + DMSO) sulandırıldı, 500 µg/mL

18- dNTP karışımı (25 µmol her biri) (Fermentas R0181)

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

dATP (100 mM)	25 µl
dCTP(100 mM)	25 µl
dGTP(100 mM)	25 µl
dTTP (100 mM)	25 µl
Distile su	900 µl
-20°C de saklandı.	

19- Marker'lar:

λDNA Hind III (Fermentas SM0101)

GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, (Fermentas SM0323)
MassRuleer DNA Ladder Low Range, (Fermentas SM0323)
IEF-MIX 3.6-9.3, (Sigma I 3018)

20- Restriksiyon enzimleri:

EcoRI, restriksiyon enzimi (Fermentas ER0271), 10 U/ μ L

NheI, restriksiyon enzimi (Fermentas ER0971), 10 U/ μ L

21- Taq DNA Polimeraz, (Fermentas EP0402), 5U/ μ L

İçeriği:

10X PCR buffer

25 mM MgCl₂

22- Fosfat tamponu 0,1 M pH 7.0

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

13,8 g NaH₂PO₄-1 H₂O (MW=138) distile suda çözüp, 500 mL'ye tamamlandı.

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

26,81 g Na₂HPO₄-7 H₂O (MW=268,1) distile suda çözüp, 500 mL'ye tamamlandı.

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

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Plak Konjugasyon Deneyi

İzolatların plazmidler aracılığıyla beta-laktam direncini aktarabilme yetenekleri katı faz konjugasyon deneyi ile incelendi (134)

Gerekli malzemeler:

- Antibiyotikler: Streptomisin (1000 μ g/mL), ampisilin (10 μ g/mL), seftazidim (2 μ g/mL)
- Seçici plaklar: Mueller Hinton Agar (Oxoid) (streptomisin + ampisilin) ve (streptomisin + seftazidim)
- Nutrient Broth (Oxoid)
- Nutrient Agar (Oxoid)
- EMB (Eosin Methylene Blue, Oxoid)
- Serum fizyolojik (SF)

- Alıcı suş: Streptomisin dirençli laktöz negatif *E. coli* K-12 SA362 (Str^r)
- Verici suşlar: Tez kapsamına alınan 167 ampisilin dirençli suş.

Yöntem:

1. GÜN: Suşlar kanlı agarda canlandırıldı.
2. GÜN: Suşlar 4,5 mL nutrient broth'a pasajlandı. Bir gece 37 °C de inkübe edildi.
3. GÜN: Kontrol amacıyla alıcı ve verici suşlar seçici plaklara ekildi.
 - 4,5 mL nutrient broth içeren tüpler (verici sayısı kadar) 37 °C'ye ısıtıldı.
 - Tüplere 0,1 mL verici + 1 mL alıcı suş ilave edilerek 35 °C de 2 saat inkübe edildi.
 - Tüpler 3000 rpm de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
 - Pellet 5,6 mL SF ile çözülüp nutrient agar plaklara 100 µL ekim yapıldı.
 - Plaklar 35 °C de 18 saat inkübe edildi.
4. GÜN: Seçici plak kontrolü yapılarak üreme olup olmadığına bakıldı, üreme olmamalıdır.
 - Nutrient agar plaklarda üreyen bakteriler 5,6 mL SF ile yıkanarak toplandı.
 - 3000 rpm de 20 dk santrifüj edildi, üst kısım atıldı ve pellet 5,6 mL SF ile çözüldü.
 - Süspansiyondan seçici plaklara 100 µL aktarıldı ve 1 gece 35 °C' de inkübe edildi.
5. GÜN: Üreyen bakteriler 2. kez seçici plaklara ekildi ve bir gece inkübe edildi.
6. GÜN: Üreme olan plaklardan EMB'ye pasaj yapıldı.
7. GÜN: EMB de laktöz (-) koloni varlığı konjugasyonun gerçekleştiği şeklinde yorumlandı.

5.2.2. Plazmid Ekstraksiyonu ve Restriksiyon Analizi

Transkonjugantlardan plazmid eldesi için sıcak alkali lizis (135) ve soğuk alkali lizis (136,137) yöntemleri kullanıldı.

Sıcak alkali lizis yöntemi:

Çözeltiler:

Eritme çözeltisi:

Tris 50 mM

SDS % 3

Distile su içinde hazırlandı, 2 N NaOH ile pH 12,6'ya getirildi. Her çalışmada taze hazırlandı.

Etanol/asetat: % 95 etanol/0.12 M Na asetat

% 100 etanol 95 ml

3 M Na asetat 4 mL

dH₂O 1 ml

Yöntem:

Plazmidi alınacak bakterilerin nutrient agardaki 1 gecelik kültüründen steril kürdanlar ile 9-10 koloni alınarak 300µL alkali lizis solüsyonu-1 içeren 1,5 mL'lik ependorf tüpü içinde iyice karıştırıldı.

- Tüpler 56 °C'lik su banyosunda 45 dakika bekletildi.
- Eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkaol karışımı eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- + 4 °C'de 14,000 devirde 5 dakika santrifüj edildi, üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Bu kısım akışkan olmadığına önceki basamak yenilendi.
- Plazmid DNA'sını çöktürmek için 2,5 hacim etanol/asetat solüsyonu ilave edildi ve buz üzerinde en az 10 dk bekletildi.
- + 4 °C'de 14,000 devirde 15 dakika çevrilerek DNA pelleti elde edildi. % 70'lik etanol ile pellet yıkandıktan sonra oda ısısında kurutuldu.
- Çökelti mL başına 50 µg RNaz içeren 50 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ile sulandırılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi ve -20 °C'de saklandı. Bu yöntemle elde edilen ürünler sadece elektroforez için kullanıldı.

Soğuk alkali lizis yöntemi:

Çözeltiler:

- I- 50 mM glukoz
25 mM Tris.Cl
10 mM EDTA Otklavda steril edilip 4 °C'de saklandı.
- II- 0.2 N NaOH
% 1 SDS Her çalışmada taze hazırlandı.
- III- 3 M sodyum asetat (pH 5,2)

Yöntem:

Çalışmaya başlamadan önce çözelti I ve III buza kondu.

- 1,5 mL bakteri sıvı kültürleri 1,5 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı. + 4 °C'de 14,000 devirde 30 saniye santrifüj edildi, sıvı kısım atılarak pellet elde edildi.
- Pellet 100 µL soğuk çözelti I'de vorteks ile süspansiyon haline getirildi.
- 200 µL çözelti II eklendi, çalkalamadan elle çevrilerek karıştırıldı.
- 150 µL çözelti III eklendi, nazikçe çalkalandı ve buz üzerinde 10 dakika bekletildi.
- 14,000 devirde + 4 °C'de 5 dakika çevrildi, üst sıvı temiz bir tüpe aktarıldı (aktarma yaparken sıvının hacmi yaklaşık olarak ölçüldü).

- Toplam hacmin iki katı kadar en az % 95'lik etanol ekleyip çalkalandı ve 2 dakika oda ısısında bekletildi.
- 14,000 devirde + 4 °C'de 5 dakika çevrildi. Hiç sıvı kalvayacak şekilde üst sıvı atıldı.
- % 70 etanol ile çökelti yıkanıp yeniden çöktürüldü ve oda ısısında kurutuldu.
- Plazmid DNA çökeltisi 50 µg/mL RNaz içeren 50 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA) ile sulandırılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi ve -20 °C'de saklandı.

Bu yöntemle elde edilen plazmid DNA'sı agaroz jel elektroforezi, restriksiyon analizi ve PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Agaroz jel elektroforezi

Sonuçların değerlendirilmesi amacı ile, 1X TBE içinde % 0,7 agaroz jel hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. 75 ml eriyik içine 5 mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5 µl eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Plazmid DNA'ları jel yükleme bufferi ile 1/6 oranında (4 µL jel yükleme buffer + 20 µL plazmid) karıştırılarak her bir kuyuya 24 µl olacak şekilde pipetlendi. Her jelde örneklerin yanısıra λ DNA Hind III marker büyüklük belirleyici olarak kullanıldı. Jel, 1X TBE içinde 120 V'da, bromfenol mavisi bandı jelin sonuna ulaşana kadar yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi ve görüntüledi.

Değerlendirme: Marker ve örneklere ait bandların kuyudan uzaklıkları ölçüldü, marker DNA parçalarının yürüme mesafesi (cm cinsinden) "X" eksenine, marker DNA parçalarının baz uzunluğunun (bp cinsinden) \log_{10} 'u "Y" eksenine gelecek şekilde (137), Microsoft Office 2000 Excell programı kullanılarak X/Y dağılım grafiği oluşturuldu. Elde edilen eğrinin ($R^2 > 0,98$) eğim formülünden örnek plazmid DNA'ların baz uzunluğu hesaplandı. Çoklu band izlenen örneklere karşılık gelen parental suşların da plazmid ekstraksiyonu yapıldı ve plazmid transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği kuşkusunu gidermek için parental ve transkonjugant plazmidleri karşılaştırıldı.

Restriksiyon analizi

Tek plazmid bandı izlenen örneklerde plazmid DNA'sı EcoRI enzimi ile kesildi. Bu işlem, enzim miktarı 1-5 U arasında, plazmid ekstraktı miktarı da 10-20 µL arasında değiştirilerek yapıldı. Reaksiyon hacmi 30 µL olacak şekilde enzim ve plazmid ekstraktına enzim bufferı ve distile su ilave edilerek karıştırıldı. 2-3 saat 37 °C'lik su banyosunda bekletilerek yukarıda anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezi yapıldı ve değerlendirildi.

5.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların ve transkonjugantların minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK), mikrodilüsyon yöntemi ile NCCLS önerilerine uyularak belirlendi (17). Bu test için U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakları kullanıldı.

Antibiyotikler: Amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit (2:1), sefoksitin, aztronam, seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve imipenem. Antibiyotiklerin 1024 µg/mL olacak şekilde stok sulandırımı hazırlanarak -40 °C'de saklandı.

Besiyeri: Mueller Hinton Broth

Kalite kontrol suşu: *E. coli* ATCC 25922

Yirmidört saatlik bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle inokulum hazırlanıp, mikrodilüsyon plağındaki son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 koloni/mL olacak şekilde sulandırım yapıldı. Bir bakteri için bir plak kullanıldı ve bir plakta 8 antibiyotik değerlendirildi.

Steril plaklara 50 µL Mueller-Hinton sıvı besiyeri dağıtıldı. Birinci kuyulara 50 µL antibiyotik solüsyonları (amoksisilin 1024 µg/mL; 3. kuşak sefalosporinler, aztreonam ve sefoksitin 512 µg/mL; imipenem 256 µg/mL) eklenip 10. kuyuya kadar seri dilüsyonlar yapıp 10. kuyudan 50 µL dışarı atıldı. 11 (bakteri üremesinin kontrolü) ve 12. (besiyeri kontrolü) kuyular kontrol amacıyla kullanıldı. Bakteri süspansiyonundan 12. kuyu hariç tüm kuyulara 50 µL dağıtıldı. Plaklar 35 °C'de 16-20 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

5.2.4. Beta-laktamaz çalışmaları

5.2.4.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların (GSBL) Araştırılması

NCCLS kriterlerine göre (17) izolatlarda, 3. kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin MİK değeri $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ olarak saptandığında kuşkulu GSBL varlığı olarak değerlendirilip doğrulama testleri yapıldı.

1- Çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi: Antibiyotik diskleri, Amoksisilin/klavulanat: AMC (20/10 μg), seftazidim: CAZ (30 μg), sefotaksim: CTX (30 μg), seftirakson: CRO (30 μg), aztreonam: ATM (30 μg). Sefoksitin: FOX (30 μg) olarak seçildi. McFarland 0.5 eşeline göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu Mueller Hinton Agar yüzeyine yayıldıktan sonra, merkeze bir amoksisilin/klavulanat (AMC) (20/10 μg) diski ve çevresine, disk merkezleri arası uzaklık 30 milimetre olacak şekilde yukarıda belirtilen diskler yerleştirildi. 35 °C'de 18 saat inkübasyondan sonra beta-laktam diskleri çevresindeki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru belirgin genişlemesi GSBL olumlu olarak değerlendirildi (7). Sefoksitin diski, sefoksitin direncine neden olan AmpC enzimi üreten suşlar açısından kullanıldı.

2- Modifiye çift disk sinerji (MÇDS) yöntemi: Dirence bağlı olarak beta-laktam ajanların zon çapları daraldığında standart yöntem ile GSBL olumsuz bulunan suşlar, AMC ve diğer beta-laktam diskleri arasındaki uzaklık 20 mm'ye indirilerek yeniden incelendi (106).

3- Beta-laktam disklerine klavulanik asit ilavesi: ÇDS ve MÇDS yöntemleri ile GSBL olumsuz veya kuşkulu olan suşlar, genişlemiş spektrumlu beta-laktam disklerine 10 μg klavulanik asit ilave edilerek tekrar incelendi. Beta-laktam disklerinin herhangi birinin zon çapında $\geq 5 \text{ mm}$ genişleme görülmesi GSBL olumlu olarak değerlendirildi (17).

5.2.4.2. İndüklenebilir Beta-Laktamazların (İBL) Araştırılması

Disk indüksiyon testi: Kuvvetli bir indükleyici ajan olarak imipenem diski ile 3. kuşak sefalosporin diskleri, aralarındaki mesafe 1,5-2 cm olacak şekilde yan yana antibiyotik duyarlılık plağına yerleştirildi. Sefalosporin diskinin inhibisyon zonunda, imipeneme bakan tarafta bir düzleşme olması İBL varlığı olarak değerlendirildi (61).

5.2.4.3. Beta-Laktamaz Eldesi

Transkonjugant beta-laktamazlarının eldesi için sonikasyon yöntemi kullanıldı. Bunun için suşların Nutrient Agardaki kültürleri 1 mL 100 mM (pH 7.0) fosfat tamponu ile yıkanarak 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine toplandı ve süspansiyon haline getirildi. Buzlu su üzerinde sonikatör (Vibracell, Sonics & Materials, Danbury Connecticut USA) probu tüp içine daldırılarak 8 mikron genlikte 15'er saniyelik 3 işlem (aralarda dinlenme yaparak) ile bakteriler parçalandı. Sonikat, + 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika çevrilerek beta-laktamazları içeren üst sıvı toplandı ve - 40 °C'de saklandı. Sonik ekstrede beta-laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile saptandı. 30 µL sonik ekstre, 100 µL nitrosefin (50 µg/mL) çözeltisi ile karıştırıldı. Enzimin, nitrosefinde bulunan beta-laktam halkasındaki amid bağı parçalamasıyla rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi olumlu olarak değerlendirildi. Renk değişimi olmayan ve renk değişim süresi 5 dakikayı aşan örnekler için sonikasyon işlemi tekrarlandı. Ayrıca her enzim için renk değişim süreleri kaydedildi. İzoelektrik odaklama yönteminde aynı sürelerle sahip örnekler bir arada incelendi (8).

5.2.4.4. Beta-Laktamazların İzoelektrik Odaklama (İsoelectric Focusing; IEF) Yöntemi İle İncelenmesi

İzoelektrik odaklama, proteinlerin ayırımında yaygın olarak kullanılan ve sabitlenmiş bir pH gradientinde gerçekleşen elektroforez olarak tanımlanan bir yöntemdir. Proteinler sahip oldukları yüke göre anod veya katoda göç ederler ve net yükleri sıfır olduğunda sabit kalarak yoğunlaşırlar ve bant verirler. Sabit kaldıkları nokta, izoelektrik nokta (pI) veya izoelektrik pH olarak tanımlanır. Bu yöntem, beta-laktamazların izoelektrik noktalarını belirlemek amacıyla kullanıldı (138). Bunun için yarı otomatize bir elektroforez sistemi olan "PhastSystem" (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kullanıldı.

Poliakrilamid jel hazırlama ve izoelektrik odaklama:

Üretici firma (Pharmacia) yöntemine uygun olarak hazırlandı.

- TEMED (N, N, N'N'-Tetramethylenediamine) (Sigma T 7024)
- APS % 40 (Ammoniumpersulfate) (Sigma A 9164)

APS 0.4 g

Distile su 1 ml 4 °C'de 1 hafta stabil

- Akrilamid / Bisakrilamid stok solüsyonu (T= % 30, C= %3)

Akrilamid 29,1 g

Bisakrilamid 0,9 g

Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı filtre edildi. + 4 °C'de 2 hafta stabildir.

- Pharmalyte (amfolin) pH 3-10 (Pharmacia 17-0456-01)
- Jel dökme aparatları (Pharmacia)

Poliakrilamid izoelektrik odaklama jelini hazırlamak için; 2,5 mL akrilamid/bis stok solüsyonuna 0,75 mL pharmalyte ilave edilip distile su ile 15 mL'ye tamamlandı, üzerine 7 µL TEMED ve 30 µL APS ilave edilerek karıştırıldı, hızlı bir şekilde enjektöre çekilerek camların aralığı 0,5 mm olan jel kasetine aktarıldı, polimerizasyonun gerçekleşmesi için 2 saat beledikten sonra jel 40 x 50 mm ebatlarında kesilerek nemli ve kapalı ortamda + 4 °C'de saklanarak kullanıldı.

Hazırlanan jeller PhastSystem cihazına yerleştirildikten sonra firma önerilerine uyularak beta-laktamaz içeren sonik ekstratler yürütüldü. 100 µL nitrosefin çözeltisi (500 µg/mL) jel üzerine yayılarak enzim bandları görünür hale getirildi. Enzimlerin izoelektrik noktaları referans enzimler (TEM-1:5.4, SHV-1:7.6) ve protein marker (IEF-MIX 3.6-9.3; Sigma I 3018) ile karşılaştırılarak saptandı.

Hazırladığımız jellerin kalitesinden emin olmak için, kullanıma hazır jel (PhastGel IEF pH 3-9; Pharmacia 17-0543-01) kullanıldı ve örneklerin yarısı tekrar incelendi.

5.2.5. PCR İle bla_{TEM} Ve bla_{SHV} Beta-Laktamaz Genlerinin Saptanması

PCR ile TEM ve SHV genlerinin varlığı transkonjugant plazmid ekstratlerinde araştırıldı. TEM ve SHV varlığı bilinen iki örnek (+) kontrol, alıcı *E. coli* suşu ise (-) kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 10. PCR'da kullanılan Öncül setleri

Öncül		Polarite	Dizi	Bölge	Ürün Uzunluğu
bla _{TEM}	TEM-F	sense	5'-gaagacgaaaggcctcgtg-3'	6-1079 ^a	1074 bp
	TEM-R	antisense	5'-ggctgacagttaccaatgc-3'		
bla _{SHV}	SHV-F	sense	5'-cgccgggtattcttattgtcgc-3'	3-1018 ^b	1016 bp
	SHV-R	antisense	5'-tctttccgatgccgccagctca-3'		

a: gen bankası J01749 (139), b: gen bankası X98098 (30) kökenlerine göre

1- Reaksiyon karışımı: Her bir örnek için Ependorf tüpüne, buz üzerinde toplam hacim 50µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu;

• Steril distile su	37,95 µl
• 10X Taq buffer	5 µl
• 25 mM MgCl ₂	3 µl (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	2 µl (100 µM/final)
• *Öncül F (50 pmol/µL)	0,4 µl (20 pmol/µL-final)
• *Öncül R (50 pmol/µL)	0,4 µl (20 pmol/µL-final)
• Taq polimeraz (5U/µl)	0,25 µl (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	1 µl

* Her bir örnek için bla_{TEM} ve bla_{SHV} bölgelerine özgü iki ayrı öncül seti için de bu karışım kullanıldı (Tablo 10).

2- Isı döngü programı: Ependorflar ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Germany) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 30 döngü gerçekleştirildi;

TEM PCR için:

94 °C'de da 5 dakika ön denatürasyon	30 döngü
94 °C'de 1 dakika denatürasyon	
55 °C'de 1 dakika birleşme	
72 °C'de 1 dakika uzama	
72 °C'de 10 dakika son uzatma	

SHV PCR için:

94 °C'de da 5 dakika ön denatürasyon	30 döngü
94 °C'de 30 saniye denatürasyon	
68 °C'de 30 saniye birleşme	
72 °C'de 50 saniye uzama	
72 °C'de 10 dakika son uzama	

3-Elektroforez: Sonuçların değerlendirilmesi amacı ile, 1X TBE içinde % 1,5 agaroz jel hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. 50 ml eriyik içine 5 mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5 µl eklendi ve jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. PCR ürünleri jel yükleme bufferı ile 1/6 oranında (2 µL jel yükleme buffer + 10 µL çoğaltılmış ürün) karıştırılarak her bir kuyuya 12 µl, bir kuyuya da GeneRuler 100 bp DNA

Ladder Plus marker olacak şekilde jele aktarıldı. Jel 1X TBE içinde 80 V uygulanarak 60-90 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı ve Tablo 10' da belirtilen ürün uzunlukları ile uyumlu bant büyüklükleri olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.6. SHV PCR Ürünlerinin NheI Restriksiyon Enzimi İle Kesilmesi

NheI enzimi SHV tipi GSBL'lerin çoğunluğunda, 238. aminoasit pozisyonunda Glisin→Serin değişimine sebep olan G→A baz değişikliğine özgüdür. Verici kökenleri GSBL (+) olan transkonjugantlardan SHV PCR (+) olanlar restriksiyon işlemine alındı. 3 U enzim, enzimin kendi bufferı, 5µL PCR ürünü ve distile su, reaksiyon hacmi 30 µL olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 2 saat 37 °C'de bekletildikten sonra MassRuleer DNA Ladder Low Range marker (80-1031 bp) (Fermentas SM0323) eşliğinde % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. 770 ve 247 bp uzunluğunda iki band izlenmesi, SHV-1'den türev alan SHV tipi GSBL varlığı olarak değerlendirildi (30).

5.2.7. DNA Dizi Analizi

Örnek seçimi

GSBL pozitif örnekler, gönderildiği klinik servis, antibiyotik duyarlılık paternleri, izoelektrik nokta paternleri gibi benzer özellikleri dikkate alınarak gruplandırıldı. Her gruptan bir veya iki temsilci seçilerek dizileme reaksiyonuna alındı.

Dizileme reaksiyonu

TEM ve SHV DNA dizilerinin belirlenmesi için, TEM PCR sonucu elde edilen 1074 ve SHV PCR sonucu elde edilen 1016 bazlık bölgeler kullanıldı. Dizileme reaksiyonu için seçilen TEM, SHV PCR ürünleri DNA saflaştırma kiti (DNA purification kit; Fermentas K0513) ile üretici firmanın direktifi doğrultusunda saflaştırıldı. Dizileme reaksiyonları, Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kits-LC (Epicentre SE9202LC) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- I. Kit içeriği buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. Tüm malzemeler karıştırılarak homojen hale getirildi.

II. Premiks olarak işaretlenen 0,2 ml'lik bir Ependorfa toplam hacim 17 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu;

- 3.5 x SequiTherm Excel II Sequencing buffer 7.2 µL
- Infrared dye (IRD800) işaretli öncül 2 µL * (2 pmol /µL)
- SequiTherm Excel II DNA polimeraz 1 µL (5 U/µL)
- Kalıp DNA (Pürifiye edilmiş 100-250 fmol/µL) 1 µL **
- Deiyonize su ile 5,8 µL

* IRD800 işaretli öncül ışıkta bozulduğundan tüm işlemler fazla ışık görmeyen bir odada gerçekleştirildi.

** Kalıp DNA, premiks içine farklı bir odada eklendi.

III. Dizilenecek her örnek için 4 adet 0,2 µL Ependorf tüpü G, A, T, C olarak işaretlendi ve buz üzerinde ;

- G tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-LC Mix G
- A tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-LC Mix A
- T tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-LC Mix T
- C tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-LC Mix C 'den eklendi.

IV. Buz üzerinde premiks tüpünden her bir "Termination Miks" tüpüne 4 µL aktarıldı.

V. A, T, C, G tüpleri 95 ° C'de 5 dakika ısıtılarak kalıp DNA denatüre edildi.

VI. Isı döngü cihazında aşağıdaki ısılarda 30 döngü gerçekleştirildi.

95 ° C'de 30 sn

50 ° C'de 45 sn

70 ° C'de 1 dk

VII. 3 µL stop/loading buffer eklendi. Elektroforez için jele yükleninceye kadar -20 °C'de saklandı.

Jel hazırlığı

LI-COR DNA dizileme cihazı aparatları kullanılarak cam jel dökme kaseti hazırlandı.

- I. 100 mL beher içerisine sırasıyla; 21 g üre, 30,5 mL bidistile deiyonize su , 5,6 mL Rapid-Gel XL %40, 10x Long Run TBE ve 500 µL DMSO eklendi.
- II. Manyetik karıştırıcıda ve oda ısısında tamamen berraklaşmaya kadar karıştırıldı.
- III. Karışım 50 mL enjektöre çekildi ve 0,45 µm filtre ile temiz bir beher içine filtre edildi.
- IV. Karışıma 50 µL TEMED ve 350 µL taze hazırlanmış %10 APS eklendi.

- V. Hızla 50 mL'lik temiz bir enjektöre çekildi, enjektör ucu takılıp havası alındıktan sonra cam kaset 45 ° açı ile yerleştirildi. İki cam arasına ve ön camın kulakları arasında kalan bölümden başlayarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel boşaltıldı. Camlar derhal zemine paralel konuma getirildi.
- VI. Tarak (0.25 mm) arka tarafı jel içerisine 0,5 mm girecek şekilde ve cama paralel olarak yerleştirildi ve polimerizasyon için 2 saat oda ısısında bekletildi.
- VII. Tarak çıkarıldı. Camın ağzında kalan gel artıkları bir tel yardımı ile 1x TBE kullanılarak temizlendi.
- VIII. Tarak dişleri jeli delmeyecek ancak jele dokunacak şekilde yerleştirildi.
- IX. Camın ağzına buffer tankı takıldı ve camlar LI-COR DNA sequencer cihazına yerleştirildi.
- X. Tampon tankı 1x TBE ile dolduruldu.

Örneklerin Yüklenmesi

Jel yükleme tamponu eklenmiş ve G, A, T, C olarak işaretlenmiş örnekler 90 ° C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı ve her bir örnekten 2 µL jele aktarıldı. LICOR DNA sequencer cihazında; 2200V voltaj, 40mA akım, 45W güç ve 45 dakika "pre-run" koşullarda elektroforez uygulandı ve yaklaşık sekiz saat sonra bant görüntüleri ve bu bantların yarı otomatik olarak değerlendirilmesi ile elde edilen DNA dizileri kayıt edildi.

Değerlendirme

LI-COR cihazında her denemede güç kaybı probleminin ortaya çıkması nedeniyle çoğu denemede sonuç alınamadı veya güvenilir sonuçlar elde edilemedi. Bunun üzerine dizileme için seçilen ve saflaştırılan örnekler MacroGen biyoteknoloji şirketinin DNA dizileme merkezine gönderildi (MacroGen DNA sequencing, MacroGen Inc., Seian Building # 116, 8th F. Shinmun-Ro 1Ka, Chongro-Ku Seoul, Korea 110-061, <http://www.macrogen.co.kr>).

Bu merkeze gönderilmek üzere; saflaştırılan TEM ve SHV PCR ürünleri, DNA konsantrasyonu 50 ng/mL ve reaksiyon başına 20 µL olacak şekilde hazırlandı. Öncül setleri ise reaksiyon başına 10 pmol/µL olacak şekilde 100'er µL hazırlandı. Hazırlanan setler koruyucu köpük içinde dökülmeyecek şekilde ambalajlanarak uluslararası taşıma şirketi Fedex ile dizileme merkezine gönderildi. Bu merkezde örnekler, elde edilen bilgiye göre tam otomatik multi kapiller ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) dizileme cihazı kullanılarak, hem TEM hem de SHV gen bölgesi için çift taraflı (both-end) olarak dizilendi.

Elde edilen dizilerin değerlendirilmesi

Dizilemenin çift taraflı yapılması nedeniyle her PCR ürünü için elde edilen iki dizi birleştirilip tek dizi haline getirildi. Gen bankasından alınan referans diziler ile “BioEdit 5.0.9 Sequence Alignment Editor” (Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999;41:95-98.) programı kullanılarak hizalandı ve aminoasit dizilerine çevrildi. Hem nükleotit hem de aminoasit dizileri internet ortamında “blastn” ve “blastp” (nucleotide-blast, protein-blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) program kullanılarak gen bankalarındaki var olan dizilerde aranarak karşılıkları bulundu.

6. BULGULAR

6.1. İzolatların Genel Özellikleri

Anestezi yoğun bakım 36, çocuk 13, dahiliye 11, genel cerrahi 10, pediatri 8, özel kat 7, nöroloji 6, ortopedi 6, fizik tedavi ve rehabilitasyon 6, kardiyoloji 5, dahiliye yoğun bakım 5, plastik cerrahi 4, infeksiyon hastalıkları 3, üroloji 3, beyin cerrahisi 3, göğüs kalp damar cerrahisi 2, göğüs 2, KBB, hemodiyaliz, onkoloji 1'er ve servisi bilinmeyen 32 olmak üzere kliniklerden gönderilen örneklerden soyutlanan ve ampisilin dirençli olarak seçilen 167 kökenin türlere göre dağılımı tablo 11'de görülmektedir. Çalışmalar esnasında bir *K. pneumoniae* kökeni kontaminasyon nedeniyle çalışmadan çıkarıldı ve işlemler 166 köken üzerinden yapıldı.

Tablo 11. Ampisilin dirençli izolatların türlere göre dağılımı

Bakteri	Sayı
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	92 (91)*
<i>Escherichia coli</i>	53
<i>Enterobacter cloacae</i>	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3
<i>Morganella morganii</i>	3
<i>Citrobacter freundii</i>	2
TOPLAM	167 (166)*

*: 1 izolat kontaminasyon nedeniyle çalışmalardan çıkarıldı.

6.2. Konjugasyon Deneyi İle Direnç Aktarımı Bulguları

Ampisilin dirençli 166 izolatın 74'ünde (% 44,6) direnç aktarım gerçekleşti. Direnç aktarım oranları Tablo 12'de gösterilmiştir. Konjugasyon oranı *K. pneumoniae*'da %49,5, *E. coli*'de %45,3 bulunmuştur. Transkonjugantlardan 38'inin (%22,9) seftazidim içeren seçici besiyerinde üredikleri görüldü. Bu durum ampisilin direnci yanında olası 3. kuşak sefalosporin direncinin aktarılabilirdiğini gösterdi (Tablo 12).

Tablo 12. izolatların direnç aktarım oranları^x

Bakteri	Sayı	Konjugasyon (+) sayı (%)	Seçici besiyerinde üreme (+) Sayı (%)	
			STR+AMP*	STR+CAZ*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91	45 (49,5)	45 (49,5)	28 (30,8)
<i>Escherichia coli</i>	53	24 (45,3)	24 (45,3)	8 (15,1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	3	3	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	4	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1	1	1
<i>Morganella morganii</i>	3	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1	1	-
TOPLAM	166	74 (44,6)	74 (44,6)	38 (22,9)

x: Bazı sayılarda anlamlı olmayacağı için % hesabı yapılmamıştır.

*: STR+AMP(streptomisin 1000 µg/mL + ampisilin 10 µg/mL); STR+CAZ (streptomisin 1000 µg/mL + seftazidim 2 µg/mL)

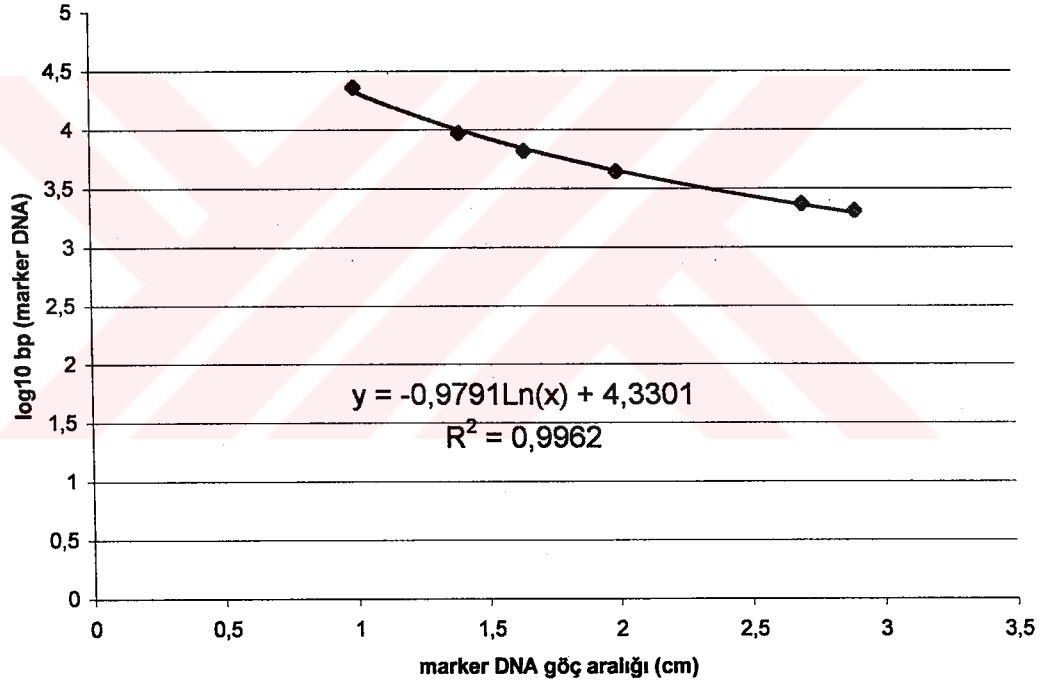
6.3. Plazmid Analizi

Transkonjugantlar üzerinden yapılan plazmid analizi sonuçlarına göre 59 örnekte (%79,7) 7-212 kb arasında değişen büyüklüklerde plazmid saptandı. 15 transkonjugantta ise plazmid belirlenemedi. Bazı plazmid band örnekleri Resim 1'de görülmektedir. Plazmid büyüklükleri, λ DNA HindIII marker DNA parçalarının büyüklükleri ve göç aralıkları ile oluşturulan Şekil 1'de görülen grafiğin eğim formülü kullanılarak hesaplandı.

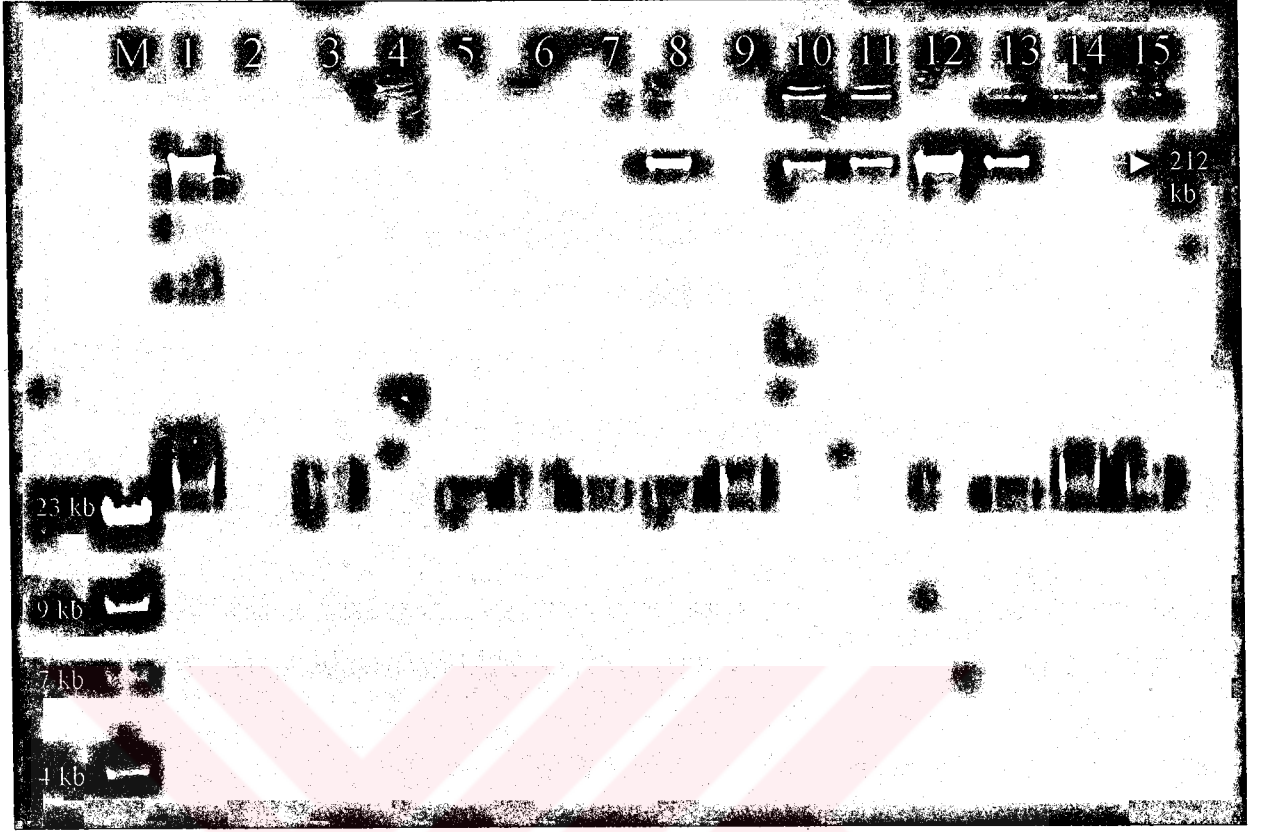
Plazmid izole edilebilen 59 transkonjugantta 18 farklı plazmid ve 36 farklı plazmid profili belirlenmiştir. Bu profillerin, köken aldıkları bakteri türlerine göre dağılımı ve profili oluşturan plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri Tablo 13'de görülmektedir. Bu profillerden TPP28, TPP17 ve TPP29 sırasıyla, suşların %15,3, %8,5 ve %6,8'inde yer almışlardır.

Plazmidlerin sıklığına baktığımızda; 67 kb'lık plazmid 59 kökenin 20'sinde (%33,9) yer almıştır. Bunu 123 kb (%25,4), 17 kb (%23,7) ve 212 kb'lık (%16,9) plazmidler izlemektedir (Tablo 14). Plazmidlerin birlikte bulunma durumları incelendiğinde, 67 ve 123 kb %13,6, 123 ve 144 %10,2, 67 ve 102 kb %8,5, 28 ve 212 kb %8,5 sıklıkta saptanmışlardır. 3'lü ve 4'lü birlikteliklerin sıklığı ise %1,7-5,8 arasında değişmektedir (Tablo 14).

Tek plazmid bandı izlenen örneklere EcoRI enzimi ile restriksiyon işlemi uygulandı. Ancak yeterli DNA miktarı elde edilemediğinden kesilen DNA parçaları elektroforez ile görüntülenemedi. Ayrıca çoklu band izlenen 24 transkonjugant, parental kökenleri ile karşılaştırılarak plazmidlerin aktarılmış olduğu doğrulandı.



Şekil 1. Plazmid büyüklüğü hesabı



Resim 1. Plazmid band görünümleri

M: λ DNA HindIII marker, 5: alıcı *E.coli* suşu; 1-4, 6-15: transkonjugant örnekleri

Tablo 13. Transkonjugantların plazmid profili

TPP ^x No	PS*	Plazmid (kb)					<i>K.pneumoniae</i> n=33	<i>E.coli</i> n=23	<i>E.cloacae</i> n=2	<i>C.freundii</i> n=1	Toplam (n=59) (%)
		7	17	67	123	144					
TPP1	5	7	17	67	123	144		1			1 (1,7)
TPP2	4	28	67	97	212		1				1 (1,7)
TPP3	4	28	42	123	212			1			1 (1,7)
TPP4	4	67	123	144	160			1			1 (1,7)
TPP5	4	7	67	97	160		1				1 (1,7)
TPP6	3	67	123	144				3			3 (5,1)
TPP7	3	67	123	212			2				2 (3,4)
TPP8	3	82	123	212				1			1 (1,7)
TPP9	3	28	42	212			1				1 (1,7)
TPP10	3	17	123	144			1				1 (1,7)
TPP11	3	10	67	123			1				1 (1,7)
TPP12	3	102	123	182			1				1 (1,7)
TPP13	3	48	67	82				1			1 (1,7)
TPP14	3	67	97	160				1			1 (1,7)
TPP15	3	35	82	123			1				1 (1,7)
TPP16	3	17	82	123				1			1 (1,7)
TPP17	2	67	102				2	2		1	5 (8,5)
TPP18	2	67	82				1	1			2 (3,4)
TPP19	2	28	212				2				2 (3,4)
TPP20	2	54	82					2			2 (3,4)
TPP21	2	28	42				1				1 (1,7)
TPP22	2	17	144					1			1 (1,7)
TPP23	2	10	67				1				1 (1,7)
TPP24	2	28	35					1			1 (1,7)
TPP25	2	48	82				1				1 (1,7)
TPP26	2	17	102					1			1 (1,7)
TPP27	2	9	48				1				1 (1,7)
TPP28	1	17					7	2			9 (15,3)
TPP29	1	10					2		2		4 (6,8)
TPP30	1	24					1	1			2 (3,4)
TPP31	1	212					2				2 (3,4)
TPP32	1	28					1				1 (1,7)
TPP33	1	144						1			1 (1,7)
TPP34	1	102						1			1 (1,7)
TPP35	1	42					1				1 (1,7)
TPP36	1	123					1				1 (1,7)
Toplam							33	23	2	1	59

x: TPP (transkonjugant plazmid profili); *: PS (plazmid sayısı)

Tablo 14. 59 transkonjugantta plazmidlerin bulunma sıklığı

Plazmid (kb)	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>C.freundii</i>	Toplam (%)
7	1	1			2 (3,4)
10	5		2		7 (11,9)
17	8	6			14 (23,7)
24	1	1			2 (3,4)
28	6	2			8 (13,6)
35	1	1			2 (3,4)
42	3	1			4 (6,8)
48	2	1			3 (5,1)
54		2			2 (3,4)
67	9	10		1	20 (33,9)
82	3	6			9 (15,3)
97	2	1			3 (5,1)
102	3	4		1	8 (13,6)
123	7	8			15 (25,4)
144	1	7			8 (13,6)
160	1	2			3 (5,1)
182	1				1 (1,7)
212	9	1			10 (16,9)
7, 67	1	1			2 (3,4)
7, 67, 97, 160	1				1 (1,7)
7, 17, 67, 123, 144		1			1 (1,7)
10, 48	1				1 (1,7)
10, 67	2				2 (3,4)
10, 67, 123	1				1 (1,7)
17, 102		1			1 (1,7)
17, 123	1	2			3 (5,1)
17, 144	1	2			3 (5,1)
17, 123, 144	1	1			2 (3,4)
17, 82, 123		1			1 (1,7)
28, 35		1			1 (1,7)
28, 42	2	1			3 (5,1)
28, 212	4	1			5 (8,5)
28, 42, 212	1	1			2 (3,4)
28, 42, 123, 212		1			1 (1,7)
28, 67, 97, 212	1				1 (1,7)
38, 82, 123	1				1 (1,7)
48, 82	1	1			2 (3,4)
48, 67, 82		1			1 (1,7)
54, 82		2			2 (3,4)
67, 82	1	2			3 (5,1)
67, 97	2	1			3 (5,1)
67, 102	2	2		1	5 (8,5)
67, 123	6	2			8 (13,6)
67, 160	1	2			3 (5,1)
67, 212	3				3 (5,1)
67, 97, 160	1	1			2 (3,4)
67, 123, 144	3	2			5 (8,5)
67, 123, 212	2				2 (3,4)
67, 123, 144, 160		1			1 (1,7)
82, 123	1	2			3 (5,1)
82, 123, 212		1			1 (1,7)
102, 123, 182	1				1 (1,7)
123, 144	1	5			6 (10,2)
123, 212	2	2			4 (6,8)

6.4. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan 74 köken ve 74 transkonjugantın tamamı ampisiline dirençli (MİK ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) bulunurken, imipeneme direnç görülmedi. Diğer beta-laktam ajanlara duyarlılık sonuçları Tablo 15’de gösterilmiştir. Transkonjugantlarda sefoksitin direnci izlenmezken, sırasıyla amoksisilin/klavulanat (2:1) kombinasyonu, aztreonem, seftazidim, seftriakson ve sefotaksime % 5.4, % 33.8, % 20.3, % 14.9 ve % 13.5 direnç görülmüştür (Tablo 15).

6.5. GSBL Varlığı

ÇDS, MÇDS ve oksimino-beta-laktam disklerine klavulanat ilavesi yöntemleriyle ampisilin dirençli 166 kökende GSBL varlığı araştırıldı. GSBL pozitifliği açısından *K. pneumoniae* % 57,1 ile birinci, *E. coli* %17 ile ikinci sırada yer aldı. Ayrıca 9 kökende İBL varlığı saptandı (Tablo 16).

Transkonjugantların %62,2’sinde GSBL (+)’liği saptandı. Burada da en fazla pozitiflik % 77,8 ile *K. pneumoniae*’da bulundu. Aktarım oranlarına bakıldığında, GSBL’lerin %73 düzeyinde aktarıldığı gözlemlendi (Tablo 17). 5 *E. cloacae* verici kökeninde 1 GSBL saptanırken, transkonjugantlarında 3 GSBL saptanmıştır. Bu 2 fazlalığa karşılık gelen verici kökenlerde inhibisyon zonu çok dar olduğu için GSBL varlığı açısından yorum yapılamamıştır.

Tablo 15. Konjugasyon (+) 74 izolat ve transkojugantlarının beta-laktam ajanlara duyarlılıkları

İzolat / Transkonjugant*	MİK aralığı (µg/mL)																	
	Amok. + Klav.			sefoksitin			aztreonam			seftazidim			seftriakson			sefotaksim		
	≥32	16	≤8	≥32	16	≤8	≥32	16	≤8	≥32	16	≤8	≥64	16-32	≤8	≥64	16-32	≤8
<i>K.pneumoniae</i> (n=45)	8	8	29	8	4	33	33	3	9	3	8	31	4	10	24	10	11	
Transkonjugantlar	4	2	39			45	21	7	17	10	21	8	5	32	7	6	32	
<i>E.coli</i> (n=24)		5	19	2		22	8	1	15	2	18	6	2	16	4	4	16	
Transkonjugantlar		3	21			24	3	4	17	4	20	3	2	19	3	1	20	
<i>E.cloacae</i> (n=3)	2		1	2		1	3					3			3			
Transkonjugantlar		2	1			3			3		3			3			3	
<i>E.aerogenes</i> (n=1)	1			1			1						1		1			
Transkonjugantlar			1			1	1							1		1		
<i>C.freundii</i> (n=1)			1						1		1						1	
Transkonjugantlar			1			1			1		1			1			1	
Toplam izolat (%)	11 (14,9)	13 (17,6)	50 (67,6)	13 (17,6)	4 (5,4)	57 (77)	45 (60,8)	4 (5,4)	25 (33,8)	5 (6,8)	27 (36,5)	40 (54)	7 (9,5)	27 (36,5)	32 (43,2)	14 (18,9)	28 (37,8)	
Toplam transkonjugant (%)	4 (5,4)	7 (9,5)	63 (85,1)			74 (100)	25 (33,8)	11 (14,9)	38 (51,3)	14 (18,9)	45 (60,8)	11 (14,9)	7 (9,5)	56 (75,7)	10 (13,5)	8 (10,8)	56 (75,7)	

*: Tüm kökenler ampisilin dirençli (MİK ≥256 µg/mL), imipenem duyarlı (MİK ≤4 µg/mL) bulunmuştur.

Tablo 16. Ampisilin dirençli izolatlarda GSBL ve İBL varlığı*

Bakteri	Sayı	GSBL (+)	İBL (+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91	52 (%57.1)	-
<i>Escherichia coli</i>	53	9 (%17)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	1	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	-	1
<i>Serratia marcescens</i>	4	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1	3
<i>Morganella morganii</i>	3	-	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2	-	-
TOPLAM	166	63 (%38)	9 (% 5.4)

*: Bazı sayılarda anlamlı olmayacağı için % hesabı yapılmamıştır.

Tablo 17. Verici kökenlerde ve transkonjugantlarda GSBL dağılımı⁺

Bakteri adı	Verici köken		Transkonjugant		Aktarım oranı (%)
	Sayı	GSBL + (%)	sayı	GSBL + (%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91	52 (%57.1)	45	35 (77.8)	35/52 (67.3)
<i>Escherichia coli</i>	53	9 (%17)	24	7 (29.2)	7/9 (77.8)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	1	3	3*	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1 ^x	1	1	1/1
<i>Morganella morganii</i>	3	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2	-	1	-	-
TOPLAM	166	63 (%38)	74	46 (62.2)	46/63 (73)

⁺: Bazı sayılarda anlamlı olmayacağı için % hesabı yapılmamıştır.

^x: GSBL+İBL; *: Aşırı direnç nedeniyle transkonjugantlara karşılık gelen 2 verici kökende GSBL saptanamadı.

Tablo 18. Transkonjugantlara göre beta-laktamazların izoelektrik noktaları

Transkonjugant NO	GSBL	PCR		SHV/NheI ^a Restriksiyon	İzoelektrik nokta (pI)							
		TEM	SHV									
<i>K.pneumoniae</i> n=45	2*	+	- +	+						8,7	9,1	
	4	+	- +	+				7,6	8,0	8,7		
	5*	+	- +	+				7,6				
	7	+	- +	+					8,0			
	8	+	- +	+					8,1			
	23*	+	- +	+					8,1	8,5	9,1	
	25	+	- +	+				7,6				
	35	+	+ +	+		5,4	5,8	6,9-7,0		8,2-8,3		
	36	+	+ +	+		5,4	5,8	6,9-7,0		8,2-8,3		
	40	+	- +	+						8,1	8,5	9,1
	41	+	- +	+						8,7	9,1	
	42	+	- +	+						8,1	8,5	9,1
	43	+	+ +	+		5,4				8,0	8,7	
	45*	+	- +	+						8,0		
	47*	+	- +	+						8,0		
	48	+	- +	+					7,6	8,0	8,7	
	6553*	-	- +	İncelenmedi				7,2	7,6			
	6741	+	- +	+					7,6			
	7363	+	- +	+						8,3	8,7	9,1
	8338*	+	- +	+						8,2	8,5	
	9252	-	- +	- ^b				7,0-7,2	7,6			
	9334	-	- +	- ^b				7,2	7,6			
	9415*	-	- +	- ^b				7,2	7,6			
	9446	-	- +	- ^b					7,6			
	9674	-	- +	- ^b				7,1	7,6			
	11823	+	- +	+							8,6	9,1
	11888	-	- +	İncelenmedi								
	15524	-	+ -	incelenmedi		5,4						
	15636	-	+ -	incelenmedi		5,4			7,6	8,0	8,5	
	15681	+	+ +	+		5,4				8,0	8,7	
	15780*	+	- +	+							8,6	9,1
	16863	+	- -	incelenmedi				7,2-7,4		7,8-8,0		
	17684	+	- +	+						8,3	8,6-8,7	9,1
	17720	+	+ +	+		5,4	6,6		7,6			
	18782*	+	- +	+					7,6			
	19111	+	- +	+							8,6-8,7	9,1
	20658	+	+ +	+		5,4						9,1
	20766	+	+ +	+		5,4						9,1
	20820*	+	+ +	+		5,4			7,6		8,8	
	21072*	+	+ +	+		5,4			7,6		8,8	

Tablo 18'in devamı

Transkonjugant NO		GSBL	PCR		SHV/NheI ^a	İzoelektrik nokta (pI)						
			TEM	SHV	Restriksiyon							
<i>K.pneumoniae</i>	23232	+	-	+	+				7,6			
	23774	+	+	+	+	5,4				8,0	8,5	
	27403	+	+	+	+	5,4				8,0	8,5	
	27449	+	+	+	+	5,4				8,0	8,5	
	27795	-	-	+	- ^b			7,1	7,6			
<i>E.coli</i> n=24	10	+	+	+	+	5,4	5,8	7,0-7,1		8,2-8,3		
	33	+	+	+	+	5,4	5,8	6,9-7,0		8,2-8,3		
	6855	-	+	-	incelenmedi	5,4					8,7	
	7134	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	7320	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	7898	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	8844	-	-	-	incelenmedi	5,4						
	9223	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	9331	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	11231	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	12056	+	+	+	+	5,4	6,0-6,1	6,8-6,9		8,2-8,4		
	16526	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	16792	+	+	+	+				7,6	8,0	8,7	
	17276	-	+	-	incelenmedi	5,4						9,0
	17706	+	-	+	+				7,6	8,0		
	17862	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	18443	-	+	-	incelenmedi	5,4						
	19229*	-	+	+	İncelenmedi	5,4						
	19512	-	-	-	incelenmedi	5,4						
	19940	+	+	+	+				7,6	8,0	8,7	
20267	+	+	+	+	5,4	5,8	6,8-7,0		8,5			
20817	-	+	-	incelenmedi	5,4							
21392	-	+	-	incelenmedi	5,4							
22243	-	+	+	İncelenmedi	5,4							
<i>E.cloacae</i> n=3	8154*	+	-	+	+						8,5	9,1
	8262	+	+	+	+	5,4				8,2		
	10962	+	+	+	+	5,4-5,7				8,2-8,5		
<i>E.aerogenes</i> n=1	21195*	+	+	+	+	5,4	6,6		7,4		8,7	
<i>C.freundii</i> n=1	21144	-	+	+	İncelenmedi	5,4						

*: Bu transkonjugantlarda plazid saptanamamıştır.

a: GSBL ve SHV PCR (+) örneklerle uygulanmıştır, SHV/NheI (+) olması SHV tipi GSBL varlığını gösterir.

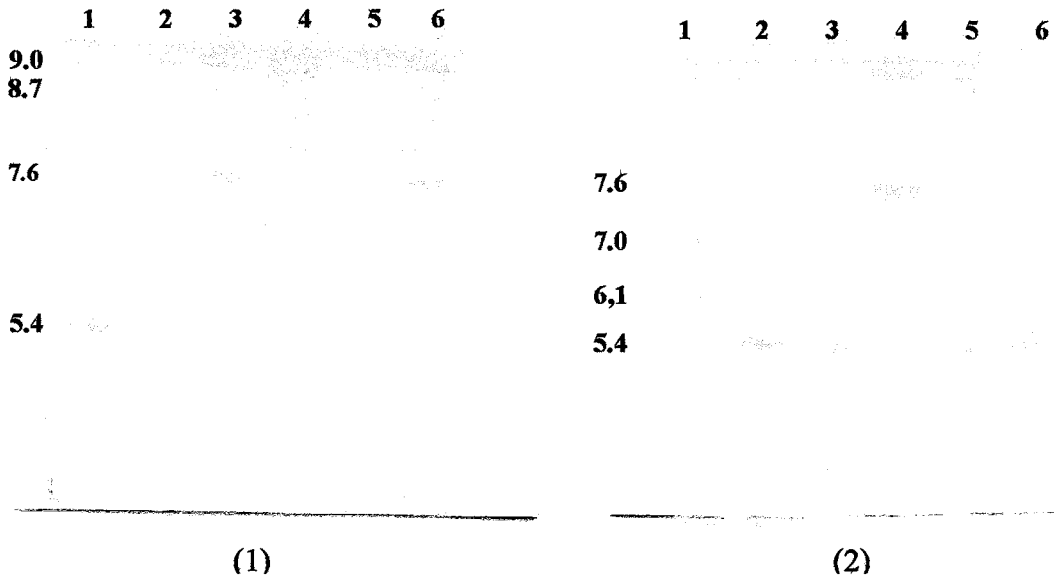
b: Verici kökenlerde GSBL (+) olduğu için işleme alınmıştır.

6.6. İzoelektrik Odaklama Bulguları

Transkonjugant enzim ekstrilerine (n=74) uygulanan IEF işlemi sonrası ekstrilerde 1-4 ayrı band saptanmıştır. Beta-laktamazların izoelektrik noktaları değerlendirildiğinde, en sık (%52.7) pI 5.4 olan bandın gözleendiği bunu sırası ile pI'ları 7.6 (%28.4), 8.2-8.5 (%27), 8.0-8.1 (%23), 8.6-8.8 (%21.6), 9.0-9.1 (%18.9), 7.1-7.4 (%10.8), 5.8-6.1 (%10.8), 6.8-7.0 (%8.1) olan bandların izlediği görüldü (Tablo 18). *E. coli* transkonjugantlarında pI 5.4 olan enzim daha yaygın iken, *K. pneumoniae*'larda pI 7.0 ve üzerindeki enzimlerin daha yaygın olduğu görüldü. İzoelektrik odaklama bulguları Tablo 18'de ve bazı enzim bandları Resim 2'de verilmiştir.

GSBL (+) transkonjugantlardaki (n=46) duruma bakıldığında, ekstrilerin 19'unda (%41.3) TEM ile uyumlu bandlar, 44'ünde (%95.6) SHV ile uyumlu bandlar, 17 örnekte (%37) TEM ve SHV ile uyumlu bandlar bir arada ve PCR sonucuna göre TEM, SHV varlığı bilinen 2 (%4.3) örnekte sadece TEM ile uyumlu bandlar izlenmiştir. GSBL (-) örneklerde (n=28) ekstrilerin 20'sinde (%71,4) TEM, 8'inde (%29.6) SHV ve 1'inde TEM ve SHV ile uyumlu bandlar izlenirken 1 örnekte bant saptanmamıştır (Tablo 18).

PCR ve IEF sonuçları dikkate alındığında; 2 örnek dışında (#16792, 19940) TEM PCR ve 6 örnek dışında (#11888, 20658, 20766, 19229, 2243, 21144) SHV PCR sonuçlarının IEF sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü (Tablo 18).



Resim 2. IEF sonrası beta-laktamaz bandları

PH aralığı 3-9 poliakrilamid jel. 1:TEM-1, 2: SHV-1 (jel 1) referans enzimleri

6.7. TEM ve SHV PCR Sonuçları

Yetmiş dört transkonjugant plazmid ekstresi TEM ve SHV genlerinin varlığı açısından incelenmiştir. PCR sonuçlarına göre, 74 transkonjugantın 39'unda (% 52.7) bla_{TEM} geni, 55'inde (%74.3) bla_{SHV} geni saptandı. *K. pneumoniae* ve *E. coli* transkonjugatlarında sırasıyla TEM geni %31.1 ve %87.5 oranlarında bulunurken, SHV geni %93.3 ve %33.3 olarak saptanmıştır. Örneklerin 24'ünde (% 32.4) TEM ve SHV genleri birlikte saptanmıştır. Alıcı *E. coli* suşu her iki enzim açısından da (-) bulunmuştur. TEM, SHV PCR sonuçları Tablo 19'da, PCR ürünlerinin bant görünüşleri Resim 3 ve 4'de gösterilmiştir. PCR ile IEF sonuçları karşılaştırıldığında önemli ölçüde uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 18).

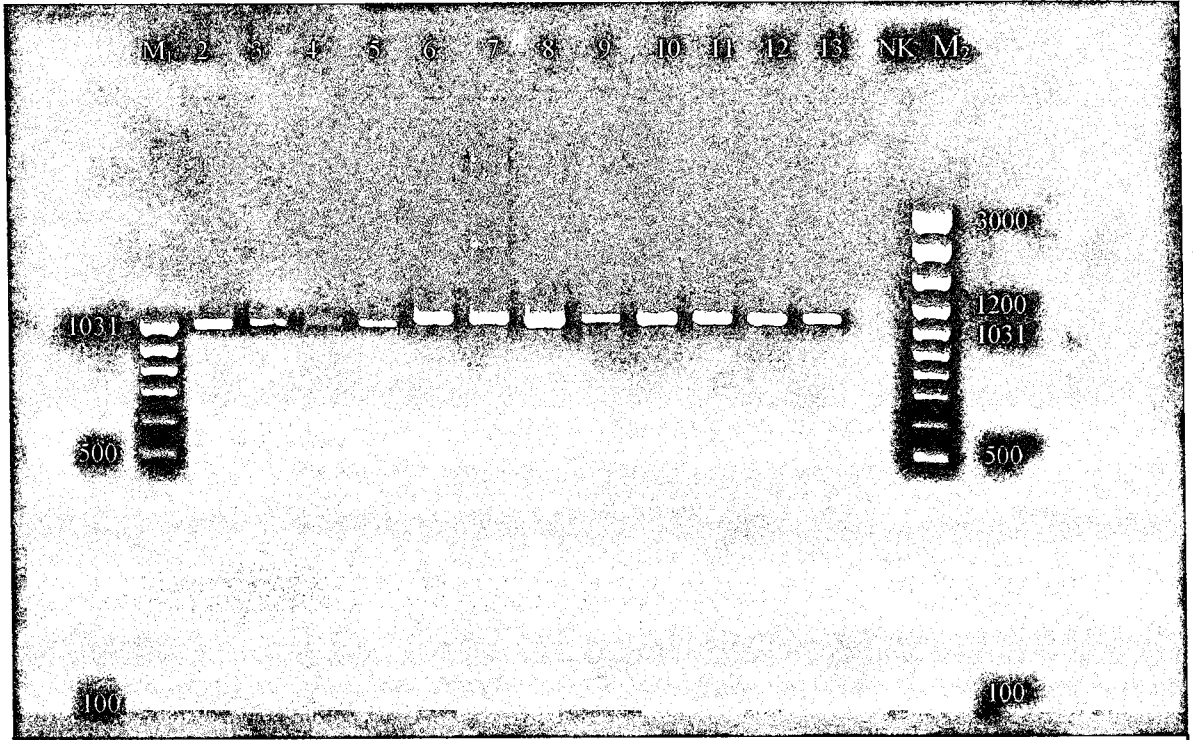
6.8. SHV PCR / NheI Restriksiyon analizi

Verici kökenleri GSBL (+) olan transkonjugantların SHV-PCR ürünlerinin NheI enzimi ile kesilmesi sonucunda, 51 örneğin 45'inde 770 ve 246 bp uzunluğunda iki kesim ürünü elde edilmiş ve olumlu olarak değerlendirilmiştir (Tablo 19). Bu sonuç, transkonjugantlarda bulunan 46 GSBL enziminden 45'inin SHV türevi olduğunu gösterdi. GSBL açısından verici kökenleri olumlu transkonjugantları olumsuz olan 6 örnekte NheI restriksiyon olumsuz bulunması, SHV tipi GSBL aktarımının gerçekleşmediği şeklinde yorumlanabilir. SHV/NheI restriksiyonun ürünü örnek bantları Resim 5'de gösterilmiştir.

Tablo 19. TEM, SHV PCR ve SHV/NheI restriksiyon bulguları *

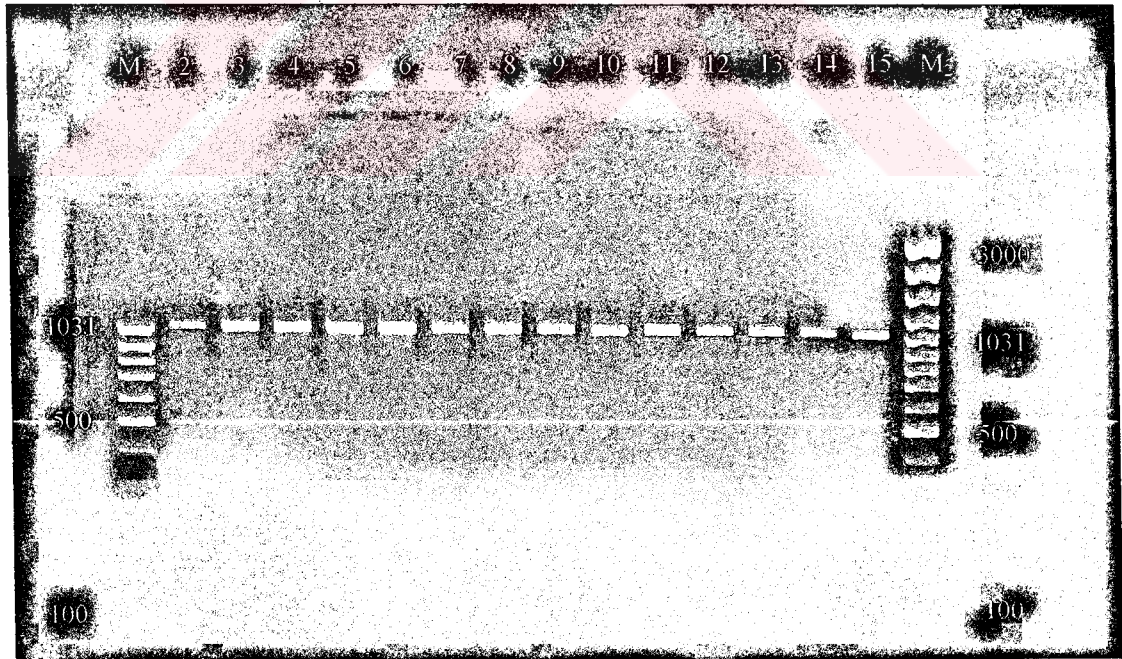
Transkonjugant	TEM-PCR + (%)	SHV-PCR + (%)	TEM+SHV PCR + (%)	SHV/NheI Restriksiyon			
				Örnek sayısı	+ (%)	- (%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45	14 (31.1)	42 (93.3)	12 (26.7)	40	34 (85)	6 (15)
<i>Escherichia coli</i>	24	21 (87.5)	8 (33.3)	8 (33.3)	7	7 (100)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	2	3	2	3	3	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	1	1	1	1	-
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	1	1	-	-	-
TOPLAM	74	39 (52.7)	55 (74.3)	24 (32.4)	51	45 (88.2)	6 (11.8)

*: Bazı sayılarda anlamlı olmayacağı için % hesabı yapılmamıştır.



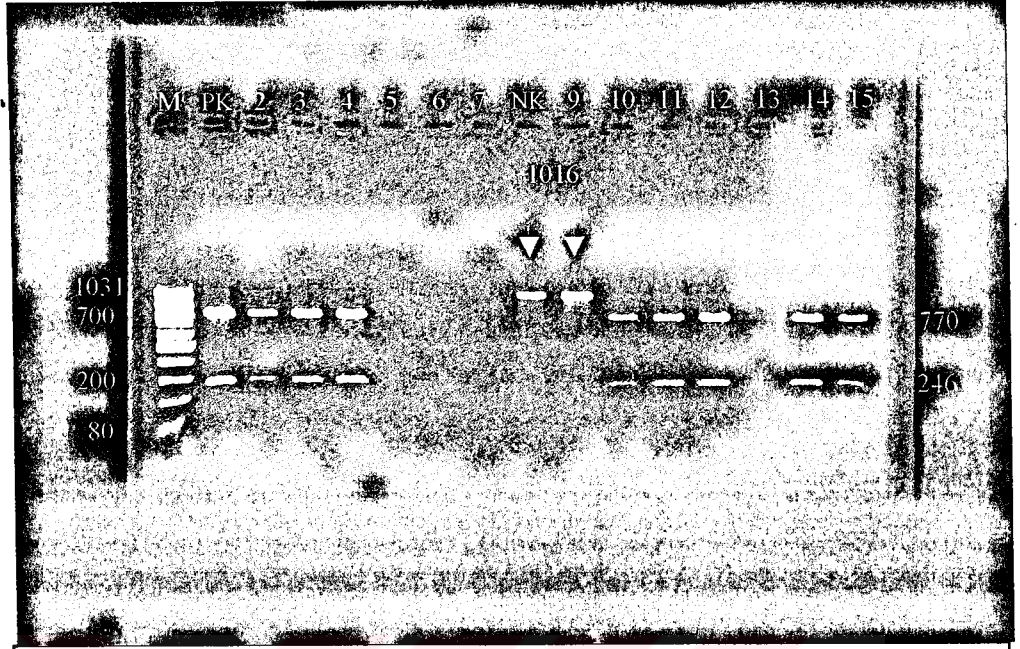
Resim 3. TEM-PCR bant örnekleri

M1: Mass ruler low range marker, M2: 100 bp DNA ladder marker, NK: negatif kontrol, 2-13: 1074 bp örnekler



Resim 4. SHV-PCR bant örnekleri

M1: Mass ruler low range marker, M2: 100 bp DNA ladder marker, 2-15: 1016 bp örnekler



Resim 5. SHV/NheI restriksiyon analizi örnekleri

M: Mass ruller low range marker, PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, 2-4,10-12,14,15: pozitif örnekler, 9: negatif örnek.

Tablo 20'nin devamı

GR	Servis	Bakteri	MLK Değerleri (µg/mL)																		ESBL	PCR	NheI	BETA LAKTAMAZ		Dizi analizi																														
			AMX						AMC						FOX									ATM						CAZ						CRO						CTX						IMP								
			VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR				VK	TR		VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	VK	TR	TEM	SHV	RES	Izoelektrik nokta (pI)										
11			45	kp	>256	>256	4	2	4	4	128	64	32	32	64	4	4	32	2	2	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,0																			
			47	kp	>256	>256	8	8	4	4	>128	32	16	16	64	2	2	64	4	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,0																				
			7	kp	>256	>256	4	2	4	2	>128	32	>128	16	128	4	4	128	4	1	0,5	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,0																				
12	ayb	9252	kp	>256	>256	4	4	4	4	0,5	<0,25	2	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,5	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,0-7,2	7,6																				
	ayb	9334	kp	>256	>256	8	4	8	4	16	16	8	8	8	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,2	7,6																					
	ayb	9415	kp	>256	>256	32	4	4	4	1	<0,25	8	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,5	0,5	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,2	7,6																					
	ayb	9446	kp	>256	>256	32	4	4	4	1	<0,25	16	<0,25	<0,25	8	<0,25	8	0,25	4	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,6	7,6																						
	ayb	9874	kp	>256	>256	8	4	8	2	1	<0,25	8	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,1	7,6																						
13	gcer	27795	kp	>256	>256	4	2	2	2	>128	<0,25	>128	<0,25	<0,25	>128	<0,25	>128	32	2	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7,1	7,6																						
		8	kp	>256	>256	8	2	4	4	64	32	64	32	64	32	32	8	8	32	2	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,1	8,5	9,1																					
		23	kp	>256	>256	1	1	2	2	64	16	64	16	64	64	2	2	32	2	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,1	8,5	9,1																						
14		40	kp	>256	>256	4	2	128	2	>128	64	64	64	64	64	2	2	32	2	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,1	8,5	9,1																						
		42	kp	>256	>256	2	2	4	4	64	64	32	16	4	1	4	2	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,1	8,5	9,1																						
		8338	kp	>256	>256	8	4	4	4	>128	16	>128	32	128	4	64	4	64	4	2	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,2	8,5																							
15		41	kp	>256	>256	4	1	4	2	128	16	64	16	64	2	2	2	64	2	2	2	2	+	+	+	+	+	+	+	+	8,7	9,1																								
	ayb	8154	ec	>256	>256	8	4	4	4	>128	4	>128	4	128	<0,25	128	<0,25	128	2	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	8,5	9,1																									
	ayb	2	kp	>256	>256	16	2	128	4	>128	128	16	64	4	128	2	4	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	8,7	9,1																									
	gcer	11823	kp	>256	>256	4	2	16	4	>128	32	>128	16	128	1	128	4	4	2	2	2	2	+	+	+	+	+	+	+	8,6	9,1																									
16	ayb	15780	kp	>256	>256	4	2	8	2	>128	16	>128	8	128	0,25	64	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	+	+	+	+	+	+	8,6	9,1																										
	ayb	19111	kp	>256	>256	1	1	4	4	64	32	64	32	64	32	32	16	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	+	+	+	+	+	+	8,6-8,7	9,1																										
	gkdc	7363	kp	>256	>256	4	1	4	2	>128	32	>128	16	128	64	64	32	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	8,3	8,7	9,1																									
	ayb	17684	kp	>256	>256	8	4	16	2	>128	>128	>128	>128	64	32	32	32	2	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	8,3	8,6-8,7	9,1																									

*: Transkonjugant verileridir. GR: grup, VK: verici köken, TR: transkonjugant, AMX: amoksisilin, AMC: amoksisilin/klavulanat, FOX: sefoksitin, ATM: aztreonam, CAZ: seftazidim, CRO: seftriksim, CTX: seftoksim, IMP: imipenem.
 kp: *K.pneumoniae*, eci: *E.coli*, ec: *E.cloacae*, ea: *E.aerogenes*

6.9. DNA Dizi Analizi Bulguları

Dizileme reaksiyonuna alınacak örneklerin seçimi için, GSBL açısından hem verici köken hemde transkonjugant pozitif olan 45, verici köken pozitif ancak transkonjugant negatif olan 6 olmak üzere toplam 51 örnek Tablo 20’de görüldüğü şekliyle gruplandırıldı. Buna göre 18 suş grup temsilcileri olarak seçildi. 18 suştan 9’u TEM ve SHV, 9’u SHV (27 örnek) açısından incelendi. Tabloda koyu renkle gösterilen grup temsilcilerinin çift iplik DNA dizi analizi sonucunda, TEM genleri için yaklaşık 1030, SHV genleri için de yaklaşık 960 baz uzunluğunda diziler elde edildi. Dizilerin referans beta-laktamaz dizileri ile hizalanmış halleri Şekil 2 ve 3’te görülmektedir. Hizalanan nükleotid dizileri referans enzimler eşliğinde aminoasit dizilerine çevrildi. Baz ve aminoasit dizileri, bilinen enzimlerle karşılaştırılarak ve ayrı ayrı GenBank’ta sorgulanarak tiplendirildi.

İncelenen tüm TEM örneklerinin, referans enzime göre (TEM-1) bazı nükleotid değişiklikleri görülse de (Şekil 2) aminoasit düzeyinde TEM-1 enzimini kodladıkları görüldü (Tablo 21). SHV dizilerinin aminoasit değişikliklerine bakıldığında, incelenen 18 kökenin 17’sinde SHV varyantı GSBL enzimleri (SHV-2, SHV-5, SHV-12), 1’inde SHV-1 bulunmuştur. Dokuz kökende ise TEM-1 ile SHV enzimleri birlikte yer almıştır (Tablo 21). Enzimlerin 3’ü dışında diğerlerinin önceden saptanan izoelektrik noktaları ile uyumlu olduğu görüldü. SHV-5 saptanan #2, SHV-12 saptanan #41 nolu suşlarda pI 8,7 bandı görülmüş. SHV-2 saptanan #20658 nolu suşta ise SHV-2 ile uyumlu band izlenmemiştir (Tablo 20). DNA düzeyinde tiplendirilen grup temsilcisi enzimlerin diğer özellikleri incelendiğinde diğer grup üyelerinin de aynı enzim tipine sahip olma olasılığı yüksektir (Tablo 20).

Tablo 21. Beta-laktamaz tipleri ve SHV enzimlerindeki aminoasit değişiklikleri

Suş	No	Beta-laktamaz	Aminoasit pozisyonları			
			SHV-1*	Leu 35	Gly 238	Glu 240
<i>K.pneumoniae</i>	9446	SHV-1	SHV-1			
<i>K.pneumoniae</i>	5	SHV-2				
<i>K.pneumoniae</i>	17720, 20658, 21072	TEM-1 + SHV-2 ^x	SHV-2		Ser	
<i>E.coli</i>	16792	TEM-1 + SHV-2				
<i>K.pneumoniae</i>	2, 4, 7	SHV-5				
<i>E.cloacae</i>	8154	SHV-5				
<i>K.pneumoniae</i>	43	TEM-1 + SHV-5 ^x	SHV-5		Ser	Lys
<i>E.cloacae</i>	10962	TEM-1 + SHV-5				
<i>E.aerogenes</i>	21195	TEM-1 + SHV-5				
<i>K.pneumoniae</i>	8, 40, 41	SHV-12				
<i>E.coli</i>	33	TEM-1+ SHV-12 ^x	SHV-12	Gln	Ser	Lys
<i>K.pneumoniae</i>	35	TEM-1+ SHV-12				

*: GebBank X98098 nolu SHV-1 kökeni, x: SHV-2, SHV-5, SHV-12 GSBL tipi beta-laktamazlardır.

		30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
J01749 TEM-1	22	GTGATACGC	CTATTTTAT	AGGTTAATGT	CATGACATA	ATGTTTCTT	AGACGTCAGG	TGGCACTTTT	CGGGGAAATG	TGCGCGGAAC	CCCTATTGT	TTATTTTCT
DE10962	22	T										
DE33	22											
DE35	22											
DE43	22	T										
DE16792	22											
DE17720	22											
DE20658	22	T										
DE21072	22	T										
DE21195	22											
		140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
J01749 TEM-1	132	AATACATTC	AAATATGTAT	CGGTCATGA	GACATAAGC	CTGATAAATG	CTTCAATAAT	ATTGAAAAG	GAGAGATATG	AGTATTCAAC	ATTTCCGTGT	CGCCCTTATT
DE10962	130											
DE33	130											
DE35	130											
DE43	130											
DE16792	130										T	
DE17720	130										T	
DE20658	130										T	
DE21072	130										T	
DE21195	130										T	
		255	265	270	285	290	300	310	320	330	340	350
J01749 TEM-1	242	CCTTTTTTS	CGGCATTTTS	CCTTCCCTGT	TTTCTCACC	CAGAAAGCCT	GGTGAAAGTA	AAAGATGCTG	AAGATCAGTT	GGGTGCACGA	GTTGGTTACA	TGCAACTGGA
DE10962	240											
DE33	240											
DE35	240											
DE43	240											
DE16792	240											
DE17720	240											
DE20658	240											
DE21072	240											
DE21195	240											
		365	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460
J01749 TEM-1	352	CTCAACAGC	GTAAGATCC	TTGAGAGTTT	TGCCCCGAA	GACCTTTTC	CAATGATGAG	CACCTTTTAA	GTTCTGCTAT	GTTGCCGGT	ATTATCCCGT	GTTGACGCCG
DE10962	350											
DE33	350											
DE35	350											
DE43	350											
DE16792	350										T	
DE17720	350										T	
DE20658	350										T	
DE21072	350										T	
DE21195	350										T	
		470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570
J01749 TEM-1	462	GCAAGAGCA	ACTCGGTCCT	CGCATCAGCT	ATTCTTAGAA	TGATTTGGTT	GAGTACTCAC	CAGTCACAGA	AAAGCATCTT	ACGGATGGCA	TGACAGTAAG	AGARTTATGC
DE10962	460											
DE33	460											
DE35	460											
DE43	460											
DE16792	460											
DE17720	460											
DE20658	460											
DE21072	460											
DE21195	460											
		580	590	600	610							
J01749 TEM-1	572	GTGCTGCCA	TAACCATGAG	TGATAACACT	GCGGCCAACT	TATG						
DE10962	570											
DE33	570											
DE35	570											
DE43	570											
DE16792	570					T						
DE17720	570					T						
DE20658	570					T						
DE21072	570					T						
DE21195	570					T						

Şekil 2. TEM nükleotid dizileri

Numaralandırma referans suşa (J01749, TEM-1) göre yapılmıştır. Dizilerin uzunluğu 1035 bp olmasına rağmen, şekilde sadece değişiklik izlenen bölgelerin sonuna kadar gösterilmiştir

X98098 SHV-1	29	CT TTA	CTGCGCT	TTATCGG	CTTCACT	CAAGG	ATGTATT	GTG	GTTATCG	GT	ATTCG	GTGTATT	TCC	CCCTG	CCAC
DE9446	29
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	29
DE8,40,41	29
DE33,35	29
DE5,16792,17720,20658,21072	29
X98098 SHV-1	119	CC GCT	GCGGTA	CACGCC	CGCAG	CGCCT	TGAGCAA	AAACTA	AGCG	AAAGC	AGCT	GTGCGG	GTAGG	CATGA	TAGAA
DE9446	119
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	119
DE8,40,41	119
DE33,35	119
DE5,16792,17720,20658,21072	119
X98098 SHV-1	209	GA TCT	GCGCAG	GGCGC	CGC	TGACCG	CGCTG	GCGCG	CGCAT	GAAC	CGCTT	CCATG	ATGAT	CACTT	AA
DE9446	209
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	209
DE8,40,41	209
DE33,35	209
DE5,16792,17720,20658,21072	209
X98098 SHV-1	299	GT GCT	GCGCGG	GTGGAT	GCG	GTGAC	GAA	GCTGG	GA	AAGAT	CCACT	ATCGC	AGCA	GGAT	CGT
DE9446	299
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	299
DE8,40,41	299
DE33,35	299
DE5,16792,17720,20658,21072	299
X98098 SHV-1	389	GA AAA	CAACCT	TCCGAC	CGCA	TGACG	CGT	CGA	ACTCT	GCCG	CGCA	TTACCA	TGAG	CGATA	ACAGC
DE9446	389
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	389
DE8,40,41	389
DE33,35	389
DE5,16792,17720,20658,21072	389
X98098 SHV-1	479	GC CAC	CGT	CGCG	CGC	GATTG	ACTG	CTTTT	CGC	CAGAT	CGCG	ACAAC	CGTAC	CCGCT	TGAC
DE9446	479
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	479
DE8,40,41	479
DE33,35	479
DE5,16792,17720,20658,21072	479
X98098 SHV-1	569	AA TG	AGCGCT	CCCGC	CGC	CCCGC	CGC	CACTA	CCCG	CGCAT	CG	CCGAC	CCCT	CGC	AGCT
DE9446	569
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	569
DE8,40,41	569
DE33,35	569
DE5,16792,17720,20658,21072	569
X98098 SHV-1	659	AG CG	CGCTCG	CAACG	CGC	TGCTG	CGATG	GATGG	TGG	GATCG	CGG	CGTAC	CGT	CGC	CGG
DE9446	659
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	659
DE8,40,41	659
DE33,35	659
DE5,16792,17720,20658,21072	659
X98098 SHV-1	749	TT TAT	CGCGAT	AAGAC	CGG	CTGCG	CAACG	GGTGC	CGC	GGGAT	TGCG	CCCTG	CGT	CGC	CGA
DE9446	749
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	749
DE8,40,41	749
DE33,35	749
DE5,16792,17720,20658,21072	749
X98098 SHV-1	839	GT GAT	TATCTG	CGGGAT	ACG	CGGCG	AGCAT	GGCGA	GGCA	AATCA	GAAA	TGCGG	GGAT	CGGCG	GGCG
DE9446	839
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	839
DE8,40,41	839
DE33,35	839
DE5,16792,17720,20658,21072	839
X98098 SHV-1	929	CG CTA	AGCCGC	GGTGC	CGC	GGTTAT	CC	GGCCC	CGC	ACCTC	CGC	CGG	GATA		
DE9446	929
DE2,4,7,43,8154,10962,21195	929
DE8,40,41	929
DE33,35	929
DE5,16792,17720,20658,21072	929

Şekil 3. SHV nükleotid dizileri
 Numaralandırma referans suşa (X98098, SHV-1) göre yapılmıştır. Aynı diziye sahip örnekler bir arada gösterilmiştir

7. TARTIŞMA

Beta-laktamlar en yaygın kullanılan antibiyotikler ve beta-laktamazlar da bunlara karşı en önemli direnç mekanizmasıdır (59). *Enterobacteriaceae* üyeleri başta olmak üzere Gram olumsuz patojenler; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemleri inaktive edebilen, sayı ve etki spektrumları hızla artan beta-laktamaz enzimleri sentezlerler. Günümüze kadar aminoasit dizileri veya fenotipik özellikleri farklılık gösteren en az 340 beta-laktamaz tanımlanmıştır (3,4).

Günümüzde çalışmalar, beta-laktam ajanların seçici etkileri sonucu TEM-1 ve SHV-1 enzimlerinde nokta mutasyonlar sonucu oluşan, özellikle oksimino-beta-laktamlara karşı etki spektrumları geniş olan GSBL enzimleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu enzimlerin sayısı 150'yi aşmıştır(10). GSBL sentezleyen *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızla artması, bu enzimleri klinik izolatlarda doğru saptama gereğini de beraber getirmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olmalarına rağmen rutin duyarlılık testlerinde duyarlı görünebilirler (15,109).

GSBL enzimlerinin tüm dünyada hızla artması, klinik izolatlarda yaygın olmaları, plazmidlerce aktarılabilmeleri ve salgınlar, sağaltım başarısızlığı, artan mortalite gibi ciddi klinik problemlere neden olmaları nedeniyle doğru saptanmalarını zorunlu kılmıştır. Beta-laktamazların aşırı üretimi, birkaç enzimin birlikteliği veya enzime bağlı dirence diğer direnç mekanizmalarının eşlik etmesi gibi nedenlerden GSBL'leri doğru saptamada fenotip temeline dayalı yöntemler yetersiz kalabilmektedir (20-25). Günümüzde özgül enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemler mutlaka gereklidir (28-33). Özgül beta-laktamaz tipini belirlemede DNA dizi analizi halen standart olma özelliğini korumaktadır (35)

Çalışmamızda plazmid kökenli TEM ve SHV tipi beta-laktamazlar fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelenmiş, özgül GSBL tiplerini belirlemek için DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır.

Klinik örneklerden izole edilen, ampisilin dirençli olmaları nedeniyle potansiyel beta-laktamaz üreticileri olarak seçilen 166 enterik bakteride GSBL sıklığı %37,7 olarak saptanmıştır. Bunlar arasında *K. pneumoniae* ve *E. coli* sırasıyla %57,1, %17'lik oranlarla ilk sırada yer almışlardır. Ülkemizde 1999-2002 yılları arasında yapılan çalışmalarda GSBL'lerin yüksek oranda saptandığı görülmektedir. Bu çalışmaların sonuçları çeşitlilik gösterse de bizim oranlarımıza yakın olanlar çoğunluktadır. Gültekin ve ark.(37) hastane infeksiyonu etkeni *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %54 ve %21, Gökahmetoğlu ve ark. (129) klinik *Klebsiella* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %62 ve %13, Aktaş ve ark. (131) yine klinik *Klebsiella* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %58,3 ve %21,2 ile bizim çalışmamıza benzer oranlar elde etmişlerdir. Ülkar ve ark. (38) klinik *Klebsiella* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %17,1 ve %3,5, Löker ve ark.(130) hastane infeksiyonu etkeni *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %42,6 ve %3,1 ile bizim çalışmamızdan daha düşük, Özkan ve ark. (140) ise yine hastane infeksiyonu etkeni *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %66 ve %39 ile bizim çalışmamızdan daha yüksek oranlar saptamışlardır. GSBL sentezleyen bakteriler tüm dünyada yaygındır. Hasta özellikleri, farklı antibiyotik kullanma politikaları gibi nedenlerden GSBL sıklığı ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye hatta aynı birim içinde farklılıklar göstermektedir (3,141,142).

Çalışmaya alınan 166 kökenin 9'unda (*E. cloacae* 3, *E. aerogenes* 3, *M. morgani* 2, *K.oxytoca* 1) İBL varlığı da saptanmıştır (Tablo 16). İBL varlığı tam olarak gösterilememişse de *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *C. freundii* ve *M .morgani* türlerinde bu özelliğin bulunabileceği düşünülmelidir. Bu suşların, in vitro testlerde 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı görünseler bile dirençli rapor edilmeleri önerilmektedir. Çünkü bu ilaçların kullanımı ile dereprese mutantların seçilme ve tedavinin başarısız olma olasılığı yüksektir (59).

GSBL'ler oksimino-beta-laktamlara dirençli olmalarına karşın rutin duyarlılık testlerinde MİK değerleri dirençli kabul edilebilecek düzeye her zaman ulaşmaz (15). Moland ve ark. (103) ile Jacoby ve ark. (104) GSBL varlığını güvenli olarak araştırmak için MİK veya disk difüzyon testlerinden herhangi birinin tek başına kullanılmasının başarısız sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü test edilen sefalosporin ile değişebilmektedir (103). Geleneksel duyarlılık testlerindeki duyarlılık ve özgüllük

problemi nedeniyle GSBL tanısında çok sayıda özel yöntem önerilmiştir (7,17-19,59,104,107,109). Bunlar arasında ÇDS ve NCCLS sıvı dilüsyon doğrulama testleri en kolay ve en ekonomik yöntemler olarak kabul görmektedir (10). Ayrıca ÇDS testinin E Test, üç boyutlu yöntem ve diğer testlere göre daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (108,111). Buna karşın dirençli suşlarda inhibisyon zon çapları daralacağından ÇDS testi ile GSBL varlığı saptanamayabilir. Bu gibi durumlarda diskler arası uzaklık azaltılarak uygulanan MÇDS testi ile duyarlılık artmaktadır. Gülay ve ark. (106) standart yöntemle GSBL varlığını %56,8 oranında saptarken modifiye yöntem ile bu oranı %88,6 bulmuşlardır.

Bugüne değin GSBL'ler en sık *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde saptanmıştır. Ancak diğer enterik bakteriler de bu enzimleri sentezlemektedir (47). *Enterobacter* türlerinde özellikle *E. cloacae* kökenlerinde GSBL sıklığı genellikle düşük düzeyde rapor edilse de (102,109,143), De Champs ve ark. (71) Fransa'da *E. aerogenes* kökenlerinde %53,5 GSBL varlığı saptamışlardır. Tzelepi ve ark. (112) standart ÇDS testi ile *Enterobacter* türlerinde GSBL (+)'liğini %16, modifiye yöntemle birlikte %71 bulmuşlardır. Buna ek olarak modifiye yöntemde 3. kuşak sefalosporin yerine sefepim kullandıklarında GSBL (+) lik oranını %90'a kadar çıkararak aslında *Enterobacter* türlerinde GSBL (+)'liğinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda 8 *Enterobacter* spp. kökeninden 4'ünde (*E. cloacae* 3, *E. aerogenes* 1) GSBL varlığına rastladık (Tablo 17).

Bu çalışmada ÇDS, MÇDS ve kombine disk (sefalosporin disklerine klavulanat ilavesi) yöntemleri GSBL doğrulama testi olarak kullanılmıştır. Üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftazidim, seftriakson ve sefotaksim yanında monbaktamlardan aztreonem indikatör ajanlar olarak testlerde yer almışlardır. Ayrıca AmpC enzimlerinin değerlendirilmesi için sefoksitin kullanılmıştır. İki *K. pneumoniae* izolatında ÇDS ve MÇDS testleri başarısız olurken, sefalosporin disklerine klavulanik asit eklenmesiyle bu iki izolatta GSBL varlığı saptanmıştır. İki *E. cloacae* kökeninin (transkonjugantlarında GSBL varlığı doğrulandı) fazla dirençli olması nedeniyle bu üç yöntemle de olumsuz sonuç alınmıştır (Tablo 17). Bu türlerde kromozomal enzimlerin yalancı negatifliklere neden olduğu bilinmektedir (59).

Beta-laktamazları kodlayan plazmidlerin konjugasyon yoluyla gram olumsuz bakteriler arasında aktarılması beta-laktamazların yayılmasında en önemli mekanizmadır. Bu çalışmada

direnç aktarımı plak konjugasyon deneyi ile incelenmiştir. Toplam konjugasyon oranı 74/166 (%44,6) bulunurken, bu oran *K. pneumoniae* kökenlerinde %49,5, *E. coli* kökenlerinde %45,3 olarak gerçekleşmiştir. Transkonjugantların seçilmesinde ampisilin içeren seçici besiyeri yanında seftazidim içeren seçici besiyerinin de kullanılması ve transkonjugantların %22,9'unun burada üremesi, olası 3. kuşak sefalosporin direncinin de aktarıldığını göstermiştir. Transkonjugantlarda GSBL (+)'liği %62,2, GSBL aktarım oranı ise %73 olarak gözlenmiştir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda; Pai ve ark.(125) 16 *E. coli*'den 14'ünün ve 12 *K. pneumoniae*'nin tamamının, Gniadkowski ve ark. (144) toplam 12 *K. pneumoniae* ve *E. coli*'den 10'unun, Shannon ve ark. (145) 10 *K. pneumoniae*'nin tamamının GSBL özelliğini alıcı suşa aktardıklarını göstermişlerdir. Chanawong ve ark.(146) 43 enterik bakteriden 29'unun GSBL enzimlerini aktardıklarını saptamışlardır.

Beta-laktam duyarlılıkları incelendiğinde verici kökenlerin ve transkonjugantların tamamının ampisilin dirençli (MİK ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) bulunurken, imipeneme direnç saptanmamıştır. Transkonjugantlarda sırasıyla amoksisilin/klavulanat, aztreonam, seftazidim, seftriakson ve sefotaksime %5.4 (MİK ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), %33.8 (MİK ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), %20.3 (MİK ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), %14.9 (MİK ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) ve %13,5 (MİK ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) direnç saptanması, oksimino-sefalosporin direncinin önemli ölçüde aktarıldığını göstermiştir. Sefoksitin direncinin ise aktarılmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada transkonjugantların 59'unda 7-212 kb arasında değişen büyüklüklerde plazmidler saptanmış ve 36 farklı plazmid profili elde edilmiştir. Onbeş transkonjugantta ise plazmid saptanmamıştır. Bu 15 örnekte TEM ve/veya SHV PCR (+) olması ve IEF bulguları ile uyum göstermesi (Tablo 18) nedeniyle plazmid ekstraksiyonu aşmasında saptanacak düzeyde ürün elde edilemediği düşünülmüştür. Pitout ve ark. (147) plazmid saptayamadıkları transkonjugantlarda SHV tipi GSBL'lerin varlığını doğrulamışlar ancak bu duruma bir açıklama getirmemişlerdir.

Yapılan çalışmalar bir çok GSBL geninin büyüklükleri 41-300 kb arasında plazmidler üzerinde yer aldığını ve kolaylıkla bakteriler arasında transfer olduğunu göstermiştir (9,73,125,144,148). Çalışmamızda GSBL (+) 46 transkonjugantın 24'ünde >42 kb büyüklüğünde plazmidler görülürken, 10'unda büyüklükleri 10-28 kb arasında değişen

plazmidler saptanmıştır. %73'lük GSBL aktarım oranı bu plazmidlerin kolay aktarıldığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada plazmidlerin sıklığı değerlendirildiğinde, en sık (%33,9) 67 kb'lık plazmidin gözleendiği bunu 123 kb (%25,4), 17 kb (23,7) ve 212 kb (%16,9)'lık plazmidlerin izlediği saptanmıştır (Tablo 14). Bazı kökenler hariç enzim tipi ile plazmidler arasında ilişki kurulamamıştır.

GSBL üreten bakterilerin neden olduğu salgınlarda, çok sayıda hasta izolatında aynı plazmid ve/veya plazmidlerin görülmesi sık rastlanan bir durum olsa da (10), Shannon ve ark.(145) üç yıllık bir zaman diliminde hastane salgınlara neden olan GSBL (+) *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinde enzimler ve plazmidler arasındaki ilişkiyi incelemişler, GSBL kodlayan plazmidler arasında bir benzerlik saptamamışlardır. Chanawong ve ark. (146) SHV-12 taşıyan 15 transkonjugantın plazmid analizi sonucunda bu direncin 13 farklı plazmid ile taşındığını göstermişlerdir.

Plazmidler bakteri genomunun sabit bir parçası olmadığı için suşların ayırt edilmesinde iyi bir belirleyici değildir. Silva ve ark. (149)'da populasyonda spontan değişikliklerin meydana gelmesi nedeniyle klinik izolatlarda plazmid sayısında çeşitlilik olacağını vurgulamışlardır.

IEF bulgularına göre transkonjugant enzim ekstrelerinin 1-4 ayrı band içerdiği saptanmıştır. Beta-laktamazların izoelektrik noktaları değerlendirildiğinde, en sık (%52,7) pI 5.4 olan bandın gözleendiği bunu sırası ile pI'ları 7.6 (%28.4), 8.2-8.5 (%27), 8.0-8.1 (%23), 8.6-8.8 (%21.6), 7.1-7.4 (%10.8), 5.8-6.1 (%10.8), 6.8-7.0 (%8.1) olan bandların izlediği gözlenmiştir. *E.coli* transkonjugantlarında pI 5.4 olan enzim daha yaygın iken, *K. pneumoniae*'larda pI 7.0 ve üzerindeki enzimlerin daha yaygın olduğu görülmüştür. (Tablo 18). Gülay ve ark. (150) hastane infeksiyonu etkeni *K. pneumoniae* kökenlerinde en sık (%84.1) pI 7.6 olan bandı, bunu sırası ile izoelektrik noktaları 8.4 (%34.1), 8.2 (%29.5), 5.4 (%29.5), 7.8 (%20.5), 8.6-8.8 (%9.1), 7.2 (6.8), 8.8-9.2 (%4.5), 6.8 (%2.3), 7.0 (%2.3) olan bandların izlediğini göstermişlerdir.

GSBL (+) transkonjugantlarda (n=46), enzim ekstrelerin 19'unda (%41,3) TEM uyumlu bandlar, 44'ünde (%95,6) SHV uyumlu bandlar, 17 örnekte (%37) TEM ve SHV ile uyumlu bandlar bir arada ve PCR sonucuna göre TEM, SHV varlığı bilinen 2 (%4,3) örnekte sadece

TEM uyumlu bandlar izlenmiştir (Tablo 18). Ülkemizde GSBL (+) klinik kökenlerde yapılan çalışmalarda; Löker ve ark. (130) SHV-1 veya SHV-2 uyumlu bandları %92, TEM-1 uyumlu bandları %56 oranında saptamışlar, Çavuşoğlu ve ark. (150) %80 pI 7,6 olan (SHV uyumlu) ve %20 pI 5,4 olan (TEM uyumlu) enzimler saptamışlardır.

Çalışmamızda çoğunlukla GSBL (+) transkonjugantlarda TEM veya SHV ile uyumlu olabilecek bandlar yanında pI ≥ 8.0 üzerinde bandların görülmesi, Bradford (10)'un belirttiği gibi son yıllarda *Enterobacteriaceae* üyelerinde saptanan CTX-M gibi TEM ve SHV dışı GSBL'lerin var olabileceğini düşündürmüştür.

GSBL (-) örneklerde (n=28) ekstrelerin 20'sinde (%71,4) TEM, 8'inde (%29,6) SHV ve 1'inde TEM ve SHV uyumlu bandlar izlenirken bir örnekte bant saptanmamıştır. Bu örneklerin, klasik TEM-1 ve SHV-1 direnç fenotipine sahip olmaları, bu enzimlere sahip olabileceklerini düşündürmüştür. Enzim bandı saptanamayan bir örnekte (#11888) ise SHV PCR (+) olması enzimin bant verecek düzeyde sentezlenmediği şeklinde yorumlanabilir.

PCR sonuçları dikkate alındığında ; 2 örnek dışında (#16792, 19940) TEM PCR ve 6 örnek dışında (#11888, 20658, 20766, 19229, 22243, 21144) SHV PCR sonuçlarının IEF sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü. #16792 ve #19940 nolu örneklerde TEM PCR (+) olmasına rağmen uyumlu enzim bandları izlenmemiştir. Benzer durum SHV için de geçerli olup, #11888, #20658, #20766, #19229, #22243 ve #21144 nolu örneklerde SHV PCR (+) olmasına rağmen uyumlu enzim bandları görülmemiştir (Tablo 18). Bu durum bant saptanamayan örneklerde beta-laktamazların saptanacak düzeyde eksprese olmadığı biçiminde açıklanabilir.

TEM ve SHV genlerinin varlığı PCR ile araştırılırken, kullanılan öncül setleri dizileme reaksiyonunda enzimin tüm aminoasit dizisini gösterebilecek şekilde seçilmiştir. PCR sonuçlarına göre, 74 transkonjugantın 39'unda (% 52,7) bla_{TEM} geni, 55'inde (%74,3) bla_{SHV} geni saptandı. *K. pneumoniae* ve *E. coli* transkonjugatlarında sırasıyla TEM geni %31,1 ve %87,5 oranlarında bulunurken, SHV geni %93,3 ve %33,3 olarak saptanmıştır. Örneklerin 24'ünde (% 32,4) TEM ve SHV genleri birlikte saptanmıştır (Tablo 19). TEM ve SHV genlerinin birlikteliği bir çok çalışmada gösterilmiştir (21,125,142,146,152).

PCR çalışmamızda 3 örnekte TEM ve SHV genleri saptanmamıştır. GSBL (-) olan 2 örnekte (#8844, 19512) pI 5.4 olan 1'er bant, GSBL (+) olan örnekte (#16863) ise pI 7.2-7.4 ve 7.8-8.0 olan 2 bant saptanmıştır (Tablo 18). GSBL (-) örneklerin klasik TEM-1 direnç fenotipine sahip ancak PCR sonucunun olumsuz olması yorum yapmayı güçleştirmiştir. GSBL (+) örnekte ise TEM ve SHV dışı GSBL'lerin var olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda transkonjugantlarda SHV tipi GSBL varlığını göstermek için SHV PCR/NheI restriksiyon testini kullanılmıştır. Bu test ile GSBL (+) 46 transkonjugantın 45'inde SHV tipi GSBL varlığı saptanmıştır (Tablo 19). SHV tipi GSBL enzimlerini SHV-1'den ayırmayı sağlayan bu yöntem Nüesch-Indebinen ve ark.(30) tarafından geliştirilmiş ve %100 duyarlı olduğu belirtilmiştir. NheI enzimi SHV tipi GSBL genlerinde ortaya çıkan, 238. pozisyondaki glisin→serin değişimine neden olan G→A nükleotid değişikliğine özgüdür. Bu araştırmacılar seftazidim MİK değeri 0,5 µg/mL altında olan ve E Test ile GSBL (-) negatif buldukları suşlarda bu yöntemle GSBL varlığını göstermişlerdir. Bu durumu bla genlerinin düşük düzeyde ekspresyonu şeklinde açıklamışlar, bla_{SHV-GSBL} geni taşıyan her kökenin bu geni düşük düzeyde eksprese etse bile yüksek derecede dirençli hale gelme potansiyeli olduğu için bunun önemli bir bulgu olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada da 3. kuşak sefalosporin ve aztreonam MİK değerleri, tekrarlayan çalışmalarda ≤0,5 µg/mL bulunan 7 transkonjugantta GSBL varlığı NheI restriksiyonu ile saptanmıştır. Bush (11) bu durumu iki şekilde açıklamıştır. Birincisi, zayıf promoter içeren genlerin düşük düzey GSBL aktivitesine neden olabileceği, ikincisi de bir insersiyon elementi varlığında SHV genlerinin inaktive olabileceğidir. Bu nedenlerden dolayı aktif enzim sentezlenmese bile genetik testlerin beta-laktamaz varlığını gösterebileceği vurgulanmıştır. Bu durum daha önce konu edilen PCR olumlu ancak IEF bandı olumsuz olguları açıklayabilir.

NheI restriksiyon testi 238. aminoasit pozisyonunda glisin→serin değişikliği olan SHV tipi GSBL'ler için çok duyarlı bir yöntem olarak önerilse de (30) bu aminoasit değişikliğini sergilemeyen SHV-8, -18, -19, -24 (21,153-155) gibi enzimlerin ortaya çıkışı bu yöntemi etkisiz kılmıştır. Bu çalışmada daha sonra değinilecek olan dizi analizi bulgularına göre

tiplendirilen SHV tipi GSBL'lerin tamamında 238. pozisyonda glisin→serin değişikliği gözlenmiştir.

Bu çalışmada NheI restriksiyon analizine öncelikle GSBL ve SHV PCR (+) örneklerin yanısıra, GSBL açısından verici kökenleri olumlu, transkonjugantları olumsuz ve SHV PCR (+) olan 6 örnek (#9252,9334,9415,9446,9674,27795) alınmıştır. Bu 6 örnek benzer IEF paternine sahiptir (Tablo 18). Çalışma sonrasında bu örneklerde SHV_{GSBL} varlığı saptanmamıştır. Bu durum SHV tipi GSBL'leri aktarılmadığı şeklinde yorumlanabilir. Direnç fenotiplerinin klasik SHV-1 tipine uygun olması bunu desteklemektedir.

Bu çalışmada, TEM ve SHV varyantı GSBL'leri tiplendirmek amacıyla bla_{TEM} ve bla_{SHV} genlerinin DNA dizi analizi, ulaşabildiğimiz kaynaklara göre ülkemizde ilk kez uygulanmıştır. Bunun için GSBL (+) verici ve transkonjugant kökenler, örneklerin gönderildiği servis, bakteri türü, antibiyotik duyarlılık paterni, IEF paterni ve PCR sonucuna göre gruplandırılmıştır (Tablo 20). Bu gruplardan rastgele bir veya iki örnek seçilmiş, PCR ürünleri ve PCR'da kullanılan öncül setler kullanılarak çift iplik DNA dizi analizi yapılmıştır. Dizilemede enzimin tam aminoasit dizisini sağlayacak bölge hedeflenmiştir. Dizileme sonrasında TEM ve SHV genleri için sırasıyla yaklaşık 1030 ve 960 bp uzuluğunda nükleotid dizileri elde edilmiştir. Bu dizilerin karşılığında TEM örneklerinin tamamında TEM-1, SHV örneklerinde ise SHV-1 ve GSBL özelliğinde SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 enzimleri bulunmuştur.

Amino asit numaralandırmaları Ambler modeline uygun olarak yapılmıştır. TEM örneklerinin aminoasit dizilerinin TEM-1 beta-laktamaz yapısal geni ile aynı olduğu görülmüştür. SHV aminoasit dizileri için SHV-1 yapısal geni esas alınmış, 238. pozisyonda Gly→Ser değişimi görülenler SHV-2, bu değişime ilave olarak 240. pozisyonda Glu→Lys değişimi görülenler SHV-5, bu iki bölgeye ilave olarak 35. pozisyonda Leu →Gln değişimi görülenler SHV-12 olarak adlandırılmıştır. Bu bulgular, örneklerin hem nükleotit hem de aminoasit dizileri internet ortamında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sorgulanarak da doğrulanmıştır.

Çalışmamızda dizi analizi yapılan 18 kökenin 5'inde SHV-2, 7'sinde SHV-5, 5'inde SHV-12, 1'inde SHV-1 saptanmıştır. Ayrıca kökenlerin 4'ünde SHV-2 ile, 3'ünde SHV-5 ile, 2'sinde SHV-12 ile birlikte TEM-1 varlığı görülmüştür. Bu GSBL'lerin SHV varyantı

olmaları NheI restriksiyonu sonuçlarını doğrulamıştır. TEM-1'in SHV-5 veya SHV-12 ile birlikteliğini Chanawong ve ark. (146) inceledikleri *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinin çoğunluğunda göstermişlerdir.

SHV-1 ve SHV-2 7.6, SHV-5 ve SHV-12 8.2 olan izoelektrik noktalarına sahiptirler (10). Çalışmamızda bu enzimlerin 3'ü dışında diğerlerinin önceden saptanan IEF paternleri ile uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 20). SHV-5 saptanan #2 ve SHV-12 saptanan #41 nolu suşlarda yinelenen tüm çalışmalarda pI 8,7 olan bandlar görülmüş ancak yorum getirilememiş ve gerekli bir kaynak bulunamamıştır. SHV-2 saptanan #20658 nolu suşta ise SHV-2 ile uyumlu band izlenmemiş, transkonjugant direnç fenotipine bakıldığında enzim etkinliğinin zayıf olduğu bu nedenle enzim sentezinin saptanacak düzeyde olmadığı düşünülebilir. Bazı enzimlerin izoelektrik noktalarında $\pm 0,2-0,3$ sapma görülmüştür. Matthew ve ark. (138) izoelektrik noktalarında çalışmadan çalışmaya $\pm 0,2$ değişiklik olabileceğini göstermişlerdir.

Verici köken ve transkonjugantların antibiyotik duyarlılıkları temel alındığında SHV-2 enzimine sahip olanların, SHV-5 ve SHV-12'ye sahip olanlara göre beta-laktam ajanlara etkinliklerinin genelde daha az olduğu görülmüştür. SHV-5 ve SHV-12'nin etkinliklerinin ise benzer olduğu görülmüştür. Direnç fenotipi açısından Nüesch-Inderbilen ve ark.(156) bu 3 enzimin, Chanawong ve ark (146) SHV-5 ve SHV-12 enzimlerinin önemli ölçüde benzediğini saptamışlardır.

Transkonjugantların hiç birinde sefoksitin direnci görülmemiştir. Amoksisilin / klavulanat dirençli veya orta duyarlı verici kökenler ve transkonjugantlar Tablo 20'de 5, 6 ve 7. gruplarda yer almışlardır. Grup temsilcilerinin SHV-5 + TEM-1 (grup 5, 7) ve SHV-2 + TEM-1 (Grup 6) taşıması nedeniyle bu kökenlerde TEM-1 aşırı üretiminin olabileceği düşünülebilir. TEM-1 aşırı üretiminin başta amoksisilin/klavulanat olmak üzere çeşitli beta-laktam ajanlara direnç oluşturduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (20,23,24).

GSBL açısından verici kökenleri olumlu transkonjugantları olumsuz olan (SHV PCR/NheI testi ile doğrulanmıştır), direnç fenotipi kasık SHV-1 tipine uyan, 6 *K. pneumoniae* kökenini içeren grubun (Tablo 20, Grup 12) temsilcisinde DNA dizi analizi sonucu SHV-1 varlığı saptanmıştır. Bu grubun diğer üyelerinin de aynı enzime sahip olma

olasılığı yüksektir. DNA düzeyinde tiplendirilen diğer grup temsilcisi enzimlerin buldukları grubu temsil etme olasılıklarının yüksek olduğu düşünülmüştür.

SHV-2 Türkiye dahil tüm dünyada en yaygın bulunan SHV tipi enzimdir (14,40). SHV-2 kadar olmasa da SHV-5'te dünya çapında yaygındır (14). SHV-12 ise ilk olarak İsviçre'de bulunmuş (156) daha sonra Kore'de sık görülmeye başlamıştır (124,125). Son yıllarda İtalya (142) ve Tayland'da (146) sıklıkla görülmektedir.

Ülkemizde SHV-5 ve SHV-12 saptandığına ilişkin bir literatür bilgisine ulaşılamamıştır. Bu çalışma sonucunda *K. pneumoniae* kökenlerinde SHV-5 ve SHV-12, *E. cloacae* ve *E. aerogenes* kökenlerinde SHV-5, *E. coli* kökenlerinde ise SHV-12 varlığının ilk kez gösterildiği düşünülmektedir.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

GSBL enzimleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak bulunmaktadır. Son 15 yılda tıbbi önemleri nedeniyle üzerinde yoğun araştırma yapılan bir konu haline gelmiştir. Tarihi gelişimlerine bakıldığında her yeni enzimin ortaya çıkışının arkasında yeni kullanıma giren beta-laktam ajanların olduğu görülmektedir. Beta-laktam ajanların yaygın kullanımı ve bu antibiyotiklerin seçici etkisi, GSBL üreten bakteri sıklığının artmasına ve yeni enzimlerin ortaya çıkışına neden olmuştur.

Klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyeleri en sık GSBL sentezleyen Gram olumsuz patojenlerin başında gelmekte olup GSBL yanında diğer beta-laktamazları da sıklıkla üretirler. Bu özelliklerini plazmidler aracılığıyla birbirlerine ve aile dışındaki diğer türlere de aktarabilirler.

Çalışılan hastaneye, gruba, kullanılan yöntemlere göre GSBL oluşturan bakteriler ve oranları değişmekle birlikte, GSBL varlığının gittikçe büyüyen bir sorun olduğu gerçektir. Klinik izolatlarda GSBL varlığını belirlemek için çok sayıda yöntem önerilmiştir. Bu yöntemlerden hiç birisi %100 duyarlı ve özgül değildir. Enzimin aşırı ve belki yetersiz üretimi, çoklu enzim varlığı ve diğer direnç mekanizmaları ile birliktelik yanlış test sonuçlarına neden olabilmektedir. Fenotipik yöntemler arasında ÇDS, ekonomik ve kolay uygulanır olması nedeniyle GSBL saptanmasındaki yaygınlığını korumaktadır. Dirençli kökenlerde standart yöntemle olumsuz sonuç alındığında diskler arası uzaklığın azaltılmasıyla GSBL saptanmasındaki başarı artmaktadır. Günümüzde, yaklaşık 350 beta-laktamazın bilinmesi ve bunların bir çoğunda izoelektrik noktaların benzer olması beta-laktamazların tiplendirilmesinde IEF yöntemini etkisiz kılmaktadır. Fenotipik yöntemlerde ortaya çıkan sorunlar nedeniyle moleküler yöntemlerin gerekliliği artmıştır. PCR en sık kullanılan yöntemdir ancak sadece enzim sınıfını belirleyebilmektedir. PCR-RFLP ve PCR-SSCP gibi PCR tabanlı testlerin tiplendirme yetenekleri kısıtlıdır. Nükleotid dizi analizi tüm beta-laktamaz varyantlarını belirlemede altın standart olarak görülmektedir. Bu çalışma da GSBL tipleri bu yöntemle belirlenebilmiştir.

Türkiye'nin Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığının en yüksek olduğu ilk üç ülke arasında yer alması, hastanelerde GSBL üreten bakterilerin sıklığının titizlikle izlenmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada hastanemiz klinik örneklerinden soyutlanan kökenlerde saptanan SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 bazı ülkelerde salgınlar biçiminde ortaya çıkmıştır. GSBL'lerin hızlı artışı ve salgınlar, sağaltım başarısızlığı, artan mortalite gibi ciddi klinik sorunlara neden olmaları doğru saptanmalarını ve tiplendirilmelerini gerektirmektedir.

Yeni GSBL'lerin saptandığı günümüzde, beta-laktam direncine karşı savaşım için her hastanede infeksiyon ve antibiyotik kontrol programlarının güncellenmesi ve etkin uygulanması, hastane bakteriyel florası ve bunların direnç profillerine bağlı olarak en uygun GSBL izleme ve doğrulama yöntemlerinin uygulanması gereklidir.



9. KAYNAKLAR

1. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999:91-108.
2. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan Gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane Infeksiyonları Dergisi 1997; 1:38-45.
3. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlar ve karbapenemlere direnç. Hastane Infeksiyonları Dergisi 2001;5:210-229.
4. Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32:1085-1089.
5. Livermore DM. β -lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-584
6. Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1983;12:507-510.
7. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988;10:867-878.
8. Nandivada LS, Amyes SGB. Plasmid-mediated resistance in pathogenic gram-negative bacteria isolated in South India. J Antimicrob Chemother 1990;26:279-280.
9. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:164-169.
10. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-951.
11. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:361-364.
12. MacKenzie FM, Gould IM. Extended spectrum β -lactamases. J Infect 1998;36:255-58.
13. Jacoby GA. Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- β -lactams. Antimicrob Resistance 1997;11:875-887.
14. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -actamases in gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999; 44:309-318.
15. Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol 1994;32:691-696
16. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM and SHV-derived extended spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure, and function. J Antimicrob Chemother 1995;35:7-22 (Abstract).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5 and informational supplement M100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2000.

18. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL Screen. *J Clin Microbiol* 1996;34:1880-1884.
19. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; 36:1877-1882.
20. Wu PJ, Shannon K, Phillips I: Effect of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:494-498.
21. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, et al. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:647-653.
22. 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 β -lactamase and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:563-569.
23. Miro E, Del Cuerdo M, Navarro F, Sabate M, Mireleis B, Prats G. Emergence of clinical isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergistic effect with coamoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:535-538.
24. Rice LB, Carias LL, Hujer AM, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:362-367.
25. Wu TL, Siu LK, Su LH, et al. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:755-761.
26. Steward CD, Kamile Rasheed JK, Hubert SK, et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2864-2872.
27. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum β -lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1419-1422.
28. Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In: DH, Smith TF, Tenover TC, and White TJ (eds). *Diagnostic molecular microbiology*. American Society for Microbiology, Washington: D.C. 1993: 553-559.
29. Arlet GG, Brami D, Décrè A, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995;134:203-208.
30. Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the Etest. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:398-402.
31. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterization of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 2000;184:85-89.

32. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). J Antimicrob Chemother 1996; 37:797-802.
33. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Snelling AM, Hawkey PM. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. J Antimicrob Chemother 1998; 41:123-125.
34. Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coskun F. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum β -lactamases. J Clin Microbiol 1998; 36:827-829.
35. Bradford PA. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*SHV genes. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2960-2963.
36. Glay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Hastane Enfeksiyonlarından Soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Beta-Laktam Antibiyotiklere Duyarlılığının ve Beta-Laktamaz Tiplerinin İncelenmesi. Mikrobiyol Blt 1996;30:1-11.
37. Gültekin M, Oğunç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaş İ, Mamıkoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. İnfeks Derg 1999;13:515-520.
38. lkar Bahar G, Tülek N, Mert A. Gram olumsuz basillerde Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında çift disk sinerji ve E-test yöntemleri. İnfeks Derg 1999;13:385-390.
39. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, Amyes SG. High prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at a University Hospital in Turkey. J Chemother 2000;12:145-152.
40. Gr D. β -laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2002;33:102-109.
41. Çolak D. Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. In: Mutlu G, Imir T, Cengiz T, Ustaçelebi ř, Tümbay E, Mete  (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999:81-89.
42. Lee NLS, Yuen KY, Kumana CR. β -lactam antibiotic and β -lactamase inhibitor combinations. JAMA 2001;285:386-388.
43. Chambers HF. Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:261-274.
44. Shlaes DM, Gerding DN, John JF et al. Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. Clin Infect Dis 1997;25:584-599.
45. Martinez LM, Alles SH, Alberti S, Thomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. in vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and extended-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:342-348.
46. Sanders CC. Beta-lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992;14:1089-1099.

47. Nordmann, P. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis 1998; 27:S100–S106.
48. Chambers HF. Penicillin-binding protein mediated resistance in pneumococci and staphylococci. J Infect Dis 1999;179(Suppl 2):353-259.
49. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora Derg 1997;2(Ek 3):3-18.
50. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1697–1704.
51. Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13(Suppl 1):2-11.
52. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-1233.
53. Bush K. Characterization of beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:259-263.
54. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. Flora Derg 2001;6(Ek 1):3-23.
55. Bush K, Jacoby G. Nomenclature of TEM beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 1997;39:1-3.
56. Jones RN. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: The Amp C enzymes. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;31:461-466.
57. Philippon A, Arlet G, Jacoby CA. Plasmid-determined AmpC type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1-11.
58. Drusano GL. Infection in intensive care unit: β -lactamase mediated resistance among *Enterobacteriaceae* and optimal antimicrobial dosing. Clin Infect Dis 1998;27 (Suppl. 1):111-116.
59. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001;48 (Suppl. 1): 59-64.
60. Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition, Pennsylvania: Churchill Livingstone Inc, 2000:243.
61. Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992;15:824-39.
62. Livermore DM. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrob Chemother 1998; 41(Suppl. D):25-41.
63. Martinez LM, Pascual A, Hernandez-Alles S, et al. Roles of β -Lactamases and Porins in Activities of Carbapenems and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae* Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1669-1673.
64. Chanal C, Sirot D, Romaszko JP, Bret L, Sirot J. Survey of prevalence of extended spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1996;38:127-132.
65. Paltzkill T, Thomson KS, Sanders CC, Moland ES, Huang W, Milligan TW. New variant of TEM-10 β -lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1199–1200.

66. Morosini MI, Canton R, Martinez-Beltran J, et al. New extended spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:458–461 (Abstract).
67. Tessier F, Arpin C, Allery A, Quentin C. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2125–2127.
68. Bonnet R, Champs CD, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2671–2677.
69. Barroso H, Freitas-Vieira A, Duarte A. Molecular characterization of a ceftazidime-resistant *Morganella morganii* isolate producing a TEM-10 β -Lactamase *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:434–435.
70. Perilli M, Segatore B, Massis MRD, et al. TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2537–2539.
71. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J. A 1998 Survey of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3177-79.
72. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2488–2493.
73. Marchandin H, Jean-Pierre H, De Champs C, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:213-216.
74. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouveleki LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838–840.
75. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, et al. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:899–905.
76. Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordman P. Molecular characterization of OXA-20, a novel class D β -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2074–2083.
77. Fortineau N, Naas T, Gaillot O, Nordman P. SHV-type extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:685-688.
78. Gülay Z. Beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli TEM benzeri enzimler. *Ankem Derg* 1997;11:213-19.
79. Bret L, Chanel C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:183–191.
80. Lemozy J, Sirot D, Chanal C, Hue C, Labia R, Dabernat H, Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 33:2580–2582.
81. Arpin C, Labla R, Du bois V, Moury P, Souquet M, Ouentin C. TEM-80, a novel inhibitor-resistant β -lactamase in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1183-1189.

82. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM- β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:447–458.
83. Lefon-Guibout V, Speldooren V, Heym B, Nicolas-Chanoine MH. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*TEM genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:2709–2714.
84. Henquell C, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:427–430.
85. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, et al. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1322–1325.
86. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:509–513.
87. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1980–1894.
88. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:827–832.
89. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1259–1262.
90. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three Cefotaximases, CTX-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:630–637.
- 90A. Gülay Z, Biçmen M, Atay T. Cefotaximase-M type beta-lactamase production in *Escherichia coli* isolated at a university hospital in Turkey. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 May 2003, Glasgow, UK, *Clin Microbiol Infect* 2003; 9 (Suppl 1): 381.
- 90B. Açıkgöz ZC, Gülay Z, Göçer S, Biçmen M, Gamberzade Ş. CTX-M type extended spectrum beta lactamase in a clinical *Shigella sonnei* isolate. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress, 21-25 April 2002, Kemer, Antalya-Turkey.
91. Danel F, Hall LMC, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1362–1366.
92. Danel F, Hall LMC, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1881–1884.
93. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2188–2195.
94. Mugnier P, Casin I, Bouthors AT, Collatz E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum β -lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:3113–3116.
95. Nordman P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:962–969.

96. Vahaboglu H, Hall LMC, Mulazimoglu L, Dodanli S, Yildirim I, Livermore DM. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. J Med Microbiol 1995; 43:294-299 (Abstract).
97. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, et al. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. J Clin Microbiol 1996; 34:2942-2946.
98. Vahaboglu H, Ozrurk R, Aygun G, et al. Wide-spread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2265-2269.
99. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, et al. Characterization of β -lactamase gene *bla*PER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:616-620.
100. Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordman P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:622-632.
101. Silva J, Aguilar C, Ayala G, et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:997-1003.
102. Emery CL, Weymouth LA. Detection and Clinical Significance of Extended-Spectrum β -Lactamases in a Tertiary-Care Medical Center. J Clin Microbiol 1997;35:2061-2067.
103. Moland ES, Sanders CC, Thomson KS. Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? J Clin Microbiol 1998;36:2575-2579.
104. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996;34:908-911
105. Tenover FC, Mohammed JM, Stelling J, O'Brien T, Williams R. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 2001; 39:241-250.
106. Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N. Çift Disk Sinerji Yönteminde Diskler Arası Uzaklığın Sonuca Etkisi İnfeks Derg 1995;9:89-92.
107. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1998; 42:49-54.
108. Vercauteren, E., P. Descheemaeker, M. Leven, C. C. Sanders, and H. Goossens. 1997. Comparison of screening methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. J Clin Microbiol 35:2191-2197.
109. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, et al. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with Vitek ESBL test. J Clin Microbiol 1996;34:2997-3001.

110. Tenover FC, Mohammed JM, Gorton T, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4065–4070.
111. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:881–885.
112. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kermeroglou A, Tsakris A. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:542–546.
113. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta lactamses amongst *Klebsiella* spp. From intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 1998;38:409-424.
114. Thomson KS. Controversies about extended spectrum and AmpC β -lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-336.
115. Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine M. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:879-884.
116. Goussard, S. and P. Courvalin. 1999. Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 43:367-370.
- 116A. Paterson DL, Know C, Gottberg A, et al. Outcome of Cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended spectrum β -lactamases; implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2206-12.
117. Pena C, Pujol M, Ardanuy C, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;42:53-58.
118. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to β -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:196-202.
119. Kim YK, Pal H, Lee HJ, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1481-91.
120. Yang Y, Bhachech N, Bradford PA, Jett BD, Sahm DF, Bush K. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 from St. Louis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1671–1676.
121. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2368-2371.
122. Barroso H., Freitas-Vieira A, Lito LM, et al. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:611–616.
123. Gniadkowski M, Palucha A, Grzesioski P, Hryniewicz W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:3079–3085.

124. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim JV, Cho DT. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J Clin Microbiol 1998; 36:1446-1449.
125. Pai H, Lyu S, Lee JH, et al. Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Esch-erichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999; 37:1758-1763.
126. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. "Extended Spectrum Beta-Lactamases" Saptanmasında E Testi İle Çift Disk Sinerji Yöntemlerinin Karşılaştırılması. İnfeks Derg. 1995; 9: 93-95.
127. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde geniş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) direnci sıklığının araştırılması. Ankem Derg 1996; 10:14-8 (Abstract).
128. Kaygusuz A, Öngen B, Gürler N, Töreci K. Çocuk hastalardan izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. Ankem Derg 1997;11:432-444.
129. Gökahmetoğlu S, Eşel D, Karaca N, Sümerkan B. *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem, çift disk sinerji ve E test yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankem Derg 2001;15:98-102.
130. Löker K, Beşirbellioğlu B, Kısa Ö, Aydoğan H, Dizer U, Pahsa A. Hastane infeksiyonlarından izole edilen *Klebsiellapneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının saptanması ve izoelektrik fokuslama yöntemi ile tiplendirilmesi. İnfeks Derg 2001;15:319-324.
131. Aktaş AE, Şahin ÜA, Yiğit N, Al FD, Tuncel E. Gram olumsuz bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji ve E test yöntemleri ile araştırılması. İnfeks Derg 2001;15:325-328.
132. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect Dis 2002;8:321-331.
133. Arakava Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo- β -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000;38:40-43.
134. Mehr MA. Salmonellalarda direnç, çoklu ilaç direnci, beta laktamaz aktivitesi, direnç aktarımı ve plazmid profillerinin araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir, 1997.
135. Kado CI, Liu ST. Rapid Procedure for Dedection and Isolation of Large and Small Plasmids. J Bacteriol 1981; 145: 1365-1373.
136. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7:1513-1523.
137. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: Chapter 1.
138. Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88:169-178.
139. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75:3737-3741 (Abstract).

140. Özkan Ç, Oldacay M, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. *Ankem Derg* 2002; 16:65-68.
141. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe the Americans, and the Western Pasific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl. 2):S94-103.
142. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases Produced by Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 611-614.
143. Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: Seek and You May Find. *J Clin Microbiol* 1997;35:2596-2597.
144. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R, Hryniewicz W, Bauernfeind A. Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 514-520.
145. Shannon K, Stapleton P, Xiang X, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 1998;36:3105-3110.
146. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:839-852.
147. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, et al. Plasmid-Mediated Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:596-600.
148. Yuan M, Hall LMC, Savelkoul PHM, et al. SHV-13, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Patients in an Intensive Care Unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1081-1084.
149. Silva J, Gatica R, Aguilar C, et al. Outbreak of Infection with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital, *J Clin Microbiol* 2001;39:3193-3196.
150. Gülay Z. Amyes SGB. Yuluğ N. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tanımlanmasında çift disk sinerji testi ve izoelektrik odaklama yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması. *İnfeks Derg* 1999; 13: 381-384.
151. Çavuşoğlu C, Dibek ME, Saydam CÇ, Göksel S, Özkalay N, Tümbay E. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında plazmid analizi ve beta-laktamaz tiplendirmesi. *Flora* 2002;7:38-43.
152. Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, et al. Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Oncology Ward: Clinical Features and Identification of Different Plasmids Carrying both SHV-5 and TEM-1 Genes. *J Clin Microbiol* 1999;37:4020-4027.
153. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, et al. Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2382-2388.

154. Essack SY, Hall LMC, Pillary DG, McFadyen ML, Livermore DM. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 88-95.
155. Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Arakawa Y. A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamase (SHV-24) that hydrolyzed ceftazidime through a single-amino-acid substitution (D179G) in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1725-1727.
156. Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:943-949.

