

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*
KÖKENLERİNDE CTX-M BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Başak YAVUZ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER

HATAY - 2011

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*
KÖKENLERİNDE CTX-M BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Başak YAVUZ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından
1001-Y-0104 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2011

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*
KÖKENLERİNDE CTX-M BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Başak YAVUZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 30/06/2011 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Doç. Dr. Nizami DURAN
Üye : Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER
Üye : Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

Bu tez Enstitümüz Mikrobiyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

30/06/2011

Doç. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçiminde ve yapım aşamasında bana her türlü desteği sağlayan, maddi manevi yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasındaki çalışma sürecinde benden yardımlarını esirgemeyen hocalarım, Doç. Dr. Nizami DURAN'a, Yrd. Doç. Dr. Melek İNCİ'ye, Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR'a, Doç. Dr. Gülnaz ÇULHA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Naciye ERYILMAZ, Hayat ASLAN ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, manevi desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Gülşen VARLI ve Ahmet MUŞLU'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, her zaman bana güvenip başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan, kendileriyle gurur duyduğum annem Naime YAVUZ, babam Mustafa YAVUZ ve abim Emin Onur YAVUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler.....	3
2.2. Bakterilerde Antibiyotik Direnç.....	4
2.2.1. Doğal Direnç.....	4
2.2.2. Kazanılmış Direnç.....	4
2.2.2.1. Kromozomal Direnç.....	5
2.2.2.2. Plazmidlere Bağlı Direnç.....	5
2.2.2.3. Transpozonlara Bağlı Direnç.....	5
2.3. Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Gelişimi.....	5
2.3.1. PBP'de Oluşan Değişiklikler ile Antibiyotiğin Hedefine Bağlanmasının Engellenmesi.....	5
2.3.2. Dış Membran Proteinlerinde (OMP) Oluşan Değişiklikler ile İlacın Hücre İçine Girişinin Önlenmesi.....	6
2.3.3. Aktif Pompa Sistemi ile Antibiyotiğin Hücre Dışına Atımı.....	6
2.3.4. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi.....	7
2.3.5. Beta-laktamazlar.....	7
2.3.6. Beta-laktamazların Sınıflandırılması.....	8
2.3.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar.....	11
2.3.6.1.1. TEM Grubu GSBL'ler.....	11
2.3.6.1.2. SHV Grubu GSBL'ler.....	12
2.3.6.1.3. CTX-M Grubu GSBL'ler.....	12
2.3.6.1.4. OXA Grubu GSBL'ler.....	15
2.3.6.1.5. Diğer GSBL'ler.....	15
2.3.7. GSBL'lerin Klinik Önemi.....	16
2.3.8. GSBL Tanı Yöntemleri.....	18
2.3.8.1. GSBL Tarama Testleri.....	19
2.3.8.1.1. Disk Difüzyon Tarama Testi.....	19
2.3.8.1.2. Antimikrobiyal Dilüsyon Duyarlılık Testi.....	19
2.3.8.2. GSBL Fenotipik Doğrulama Testleri.....	20
2.3.8.2.1. Sefalosporin/Klavulonik asit kombinasyon diskleri.....	20
2.3.8.2.2. Broth Mikrodilüsyon.....	20
2.3.8.2.3. GSBL Saptanmasında Diğer Metodlar.....	21

2.3.8.3.1. İso-Sensitest Agarda Sefalosporin/Klavulonik Asit Kombinasyon Diskleri.....	21
2.3.8.3.2. Çift Disk Sinerji Testi.....	21
2.3.8.3.3. Klavulonik Asit Eklenmiş Agar.....	21
2.3.8.3.4. Disk Replasman Yöntemi.....	22
2.3.8.3.5. Üç-boyutlu Test.....	22
2.3.8.3.6. GSBL İçin E Test.....	23
2.3.8.3.7. Vitek GSBL Kartları.....	23
2.3.8.3.8. Moleküler Saptama Yöntemeleri.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1. Bakteri Kökenleri.....	27
3.2. Bakterilerin Klinik Örneklerden İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	27
3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar.....	28
3.4. GSBL Disk Difüzyon Tarama Testi (DDTT).....	31
3.5. GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (KDDT).....	32
3.6. Kontrol Kökenleri.....	33
3.7. PZR yöntemi ile CTX-M Genlerinin Varlığının Araştırılması.....	34
3.7.1. DNA İzolasyonu.....	34
3.7.2. CTX-M Geninin Amplifiye Edilmesi.....	35
3.7.3. Amplifiye Edilen Gen Ürünün Gösterilmesi.....	35
3.8. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ.....	53
7. KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Beta-laktam grubu antibiyotikler.....	3
Şekil 2.2. Beta-laktamazın etki mekanizması.....	7
Şekil 2.3. CTX-M enziminin dünyadaki dağılımı.....	13
Şekil 3.1. GSBL disk difüzyon tarama testi.....	32
Şekil 3.2. Sefotaksim ve sefotaksim/klavulonik asit disk doğrulama testi.....	33
Şekil 3.3. Seftazidim ve seftazidim/klavulonik asit disk doğrulama testi.....	33
Şekil 4.1. PZR Ürünlerinin agoroz jeldeki görüntüleri (Grup I, III, IV CTX-M).....	42
Şekil 4.2. PZR Ürünlerinin agoroz jeldeki görüntüleri (Grup I, II, IV CTX-M).....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
	No
Çizelge 2.1. Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları.....	10
Çizelge 2.2. GSBL' lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri.....	24
Çizelge 2.3. GSBL' lerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri.....	26
Çizelge.3.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	35
Çizelge.4.1. Kökenlerin izole edildiği materyallerin gönderildiği klinikler.....	37
Çizelge.4.2. <i>Escherichia coli</i> kökenlerine karşı 17 antimikrobiyalın µg/ml cinsinden minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri.....	38
Çizelge.4.3. GSBL varlığının saptanmasında fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması.....	39
Çizelge.4.4. Kombine disk doğrulama testlerinin karşılaştırması.....	39
Çizelge.4.5. Disk difüzyon tarama testi ile kombine disk doğrulama testlerinin karşılaştırılması.....	40
Çizelge.4.6. Kökenlerdeki <i>bla</i> _{CTX-M} varlığı ve dağılımı.....	41
Çizelge.4.7. PZR yöntemi ile saptanan <i>bla</i> _{CTX-M} varlığı ile diğer GSBL tarama ve doğrulama testlerinin karşılaştırılması.....	43
Çizelge.4.8. PZR yöntemi ile saptanan Grup I <i>bla</i> _{CTX-M} geni varlığı ile antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki.....	44
Çizelge.4.9. PZR ile saptanan Grup IV <i>bla</i> _{CTX-M} geni varlığı ile kökenlerin antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki.....	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMC	Amoksisilin/Klavulonik Asit.....
ATCC	American Type Culture Collection.....
CAZ	Seftazidim.....
CTC	Sefotaksim/Klavulonik Asit.....
CTX	Sefotaksim.....
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute.....
CZC	Seftazidim/Klavulonik Asit.....
DDTT	Disk Difüzyon Tarama Testi.....
DEPC	Di-Etil-Piro-Karbonat.....
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat.....
EMB	Eosin Methylene Blue.....
FDA	Food and Drug Administration.....
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz.....
KDDT	Kombine Disk Doğrulama Testi.....
LCR	Ligase Chain Reaction.....
MBL	Metallo Beta-laktamaz.....
MgCl ₂	Magnezyum klorür.....
MHA	Mueller Hinton Agar.....
MHB	Mueller Hinton Broth.....
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu.....
MYSTIC	Yıllık Meropenem Duyarlılık Testi Bilgi Koleksiyonu Programı.....
NaCl	Sodyum klorür.....
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein.....
PBS	Fosfat Tamponlu Su.....
PTZ	Piperasilin/Tazobaktam.....
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism.....
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat.....
SET	Sodyum EDTA Tris.....
SMART	Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends.....
SSCP	Single-strand conformational polymorphism.....
SXT	Trimetoprim/sulfametaksazol.....
TBE	Tris Borate EDTA.....
TEST	Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial.....
TE	Tris EDTA.....
TSB	Tryptic Soy Broth.....
OMP	Dış Membran Protein.....

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* Kökenlerinde CTX-M Geninin Fenotipik ve Genotipik Olarak Saptanması

Bakterilerin direnç geliştirmesinde en sık kullandıkları mekanizma sentezlenen enzimlerle ilacın inaktive edilmesi veya modifiye edilmesidir. Beta-laktamaz sentezi başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizmadır. CTX-M tipi geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten bakteriler dünyada ve ülkemizde hızla yayılmaktadır.

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* kökenlerinde GSBL varlığının dört fenotipik yöntemle araştırılması ve beta-laktamaz sentezinden sorumlu olan *bla*_{CTX-M} genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması amaçlandı.

Klinik örneklerden izole edilen ve Vitek 2 otomatize sistem ile saptanmış GSBL pozitif 100 *E. coli* ve GSBL negatif 50 *E. coli* kökeni çalışmaya dahil edildi. Vitek 2 ile antimikrobiyal duyarlılıkları ve GSBL varlığı bakılan kökenlere disk difüzyon tarama testi (DDTT), kombine disk doğrulama testleri (KDDT) uygulandı.

Vitek 2, DDTT ve sefotaksim-sefotaksim/klavulonik asit (CTX/CTC) KDDT ile 125 (%83.3) köken pozitif veya negatif aynı sonucu verirken Vitek 2 ve seftazidim-seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CZC) KDDT’de 110 (%73.3) köken, CAZ/CZC KDDT ve CTX/CTC KDDT ile de 135 (%90) köken aynı sonucu verdi. DDTT ve KDDT’lerin sonuçları karşılaştırıldığında sonuçları birbiriyle daha uyumlu bulunmuş olup DDTT ve CTX/CTC KDDT ile 138 (%92), DDTT ve CAZ/CZC KDDT ile 133 (%88.7) kökende aynı sonuç alındı. Vitek 2 ile diğer testler arasında anlamlı bir uyum saptamamıza rağmen DDTT ve KDDT’ler ile daha uyumlu sonuçlar alındı. Vitek 2 ile saptanan GSBL’lerin diğer KDDT ile doğrulanması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

PZR ile 150 kökenin %67.3’ünde *bla*_{CTX-M} geni pozitif bulundu. Bu kökenlerinde sıklık sırasına göre Grup I (%46), Grup IV (%38.7), Grup II (%20) ve Grup III (%7.3) *bla*_{CTX-M} geni taşıdığı tespit edildi.

CTX-M beta-laktamazların alt tiplerinin belirlenmesinde PZR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması faydalı olacaktır. Ayrıca, fenotipik GSBL tarama ve doğrulama testleri ile CTX-M beta-laktamaz varlığı bazen tespit edilemediğinden, genotipik olarak CTX-M sentezleyen kökenlerin saptanması diğer hastalara bulaşını önlemek için de önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, geniş spektrumlu beta-laktamaz, CTX-M

ABSTRACT

Phenotypic and Genotypic Determination of *bla*_{CTX-M} Gene in *Escherichia coli* Strains Isolated from Clinical Samples

The most common mechanism used by bacteria to develop resistance is inactivating or modifying the drug by enzymes. Synthesis of beta-lactamase is the most important mechanism for beta-lactam resistance of especially members of *Enterobacteriaceae* and Gram-negative bacteria. CTX-M type extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria are rapidly spreading in our country and throughout the world.

In this study, it was aimed to investigate the presence of ESBL synthesis by four phenotypic methods (disc diffusion screening test, combined disc confirmation test) and to determine *bla*_{CTX-M} genes responsible for beta-lactamase synthesis in *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens by polymerase chain reaction (PCR). ESBL-positive 100 and ESBL-negative 50 *E. coli* strains which were determined by Vitek 2 automated system were included in the study.

While 125 (83.3%) strains gave the same results as negative or positive with Vitek 2, DDST and CTX/CTC CDCT, 110 (73.3%) strains gave the same results with Vitek 2 and CAZ/CZC CDCT. Also 135 (90%) strains gave the same results with CAZ/CZC CDCT and CTX/CTC CDCT. When the results of DDST and CDCT tests were compared, their results were more compatible with each other. With DDST, CTX/CTC CDCT 138 (92%) strains gave the same results, and 133 (88.7%) strains gave the same results with DDST and CAZ/CZC CDCT. Although we determined significant accordance with Vitek 2 results with the other tests, more compatible results were obtained with DDST and CDCT. Thus, we reached the conclusion that ESBL results determined with Vitek 2 should be verified with CDCT tests.

Based on PCR, *bla*_{CTX-M} genes were found in 67.3% of 150 strains. According to the order of frequency, group IV (38.6%), group II (20%) and group III (7.3%) *bla*_{CTX-M} genes were carried (46%) in these strains.

Molecular methods such as PCR will be useful for the determination of subtypes of CTX-M beta-lactamases. Also, sometimes determination of CTX-M beta-lactamase synthesis is not possible by phenotypic ESBL screening and confirmation tests, genotypic detection of CTX-M producing strains is also important to prevent transmission to other patients.

Key Words: *Escherichia coli*, extended spectrum beta-lactamase, CTX-M

1. GİRİŞ

Penisilinin 1929'da keşfinden bugüne kadar çok sayıda yeni antibiyotik geliştirilerek klinik kullanıma girmiştir. Antimikrobiyal ilaçlara direnç infeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştiren ve zamanla giderek artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle de çoklu ilaç direnci hastane infeksiyonlarında tehdit oluşturmaktadır.

Bakterilerin antibakteriyel ajanlara karşı direnç geliştirmesinde en sık kullandıkları mekanizmalardan biri sentezlenen enzimler ile ilacın inaktive edilmesi veya değişikliğe uğratılmasıdır. Ayrıca bu enzimleri sentezleyen genlerin plazmidler üzerinde bulunması direncin hızla yayılımına neden olmaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotiklerin beta-laktamaz enzimleri ile hidrolizi bunun en iyi örneğidir. Beta-laktamazlar Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilerce üretilmelerine karşın, beta-laktamaz sentezi başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizmadır (Pool 2004). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), beta-laktamazlar arasında en önemli gruptur. GSBL üreten bakteriler, çeşitli beta-laktam antibiyotikleri inaktive etmektedir (Stürenberg ve Mack 2003). GSBL'ler penisilinler, 1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize ederler. Karbapenem, sefamisin ve beta-laktamaz inhibitörleri ise bu enzimlere dayanıklıdır (Philipon ve ark. 1994, Livormore ve Williams 1996). GSBL üreten mikroorganizmalar ile infeksiyon ve kolonizasyon gelişimi için genellikle hastanede uzun süre kalan ve invaziv işlemler uygulanan hastalar yüksek risk altındadırlar. Gram negatif bakteriler arasında GSBL üretiminin en sık gözlemlendiği kökenler *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*'dir.

Gram negatif bakterilerde plazmid aracılı ilk beta-laktamaz 1960 yılında tanımlanmış ve TEM-1 olarak adlandırılan enzim kan kültüründen izole edilen *E.coli* kökeninde bulunmuştur (Datta ve Kontomichalou 1965). Diğer sık karşılaşılan enzim SHV-1, *K. pneumoniae* izolatlarında çoğunlukla kromozomal, *E. coli*'de ise genellikle plazmid aracılı sentezlenir (Bradford 2001). GSBL'lerin büyük bir kısmı 1980'li yıllarda tanımlanan TEM ve SHV enzimlerinden köken almıştır. *E.coli* tarafından üretilen TEM ve SHV olmayan bir enzim 1989'da bildirilmiştir. Daha sonra bu enzimin sefotaksime karşı hidrolitik aktivitesi gösterilen CTX-M-1 olduğuna karar verilmiştir (Bernard ve ark. 1992).

CTX-M üreten izolatların 1990'larda dünyada yayılımı sınırlı olmasına rağmen son on yılda bu durum değişmiştir. Son epidemiyolojik çalışmalar GSBL üreten bakterilerde CTX-M enzimi varlığının arttığını göstermektedir (Canton ve Coque 2006, Bonnet 2004, Rossolini ve ark. 2008).

Rutin olarak uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri başta *Klebsiella* spp. ve *E. coli* olmak üzere Gram negatif bakterilerde beta-laktam direncini göstermede yetersizdir. Bu testlerle *in vitro* beta-laktam antibiyotiklere duyarlı oldukları saptanan bazı kökenlerin *in vivo* dirençli olduğu bulunmakta ve bu durum tedavide başarısızlığa yol açmaktadır (Horan ve ark. 1992).

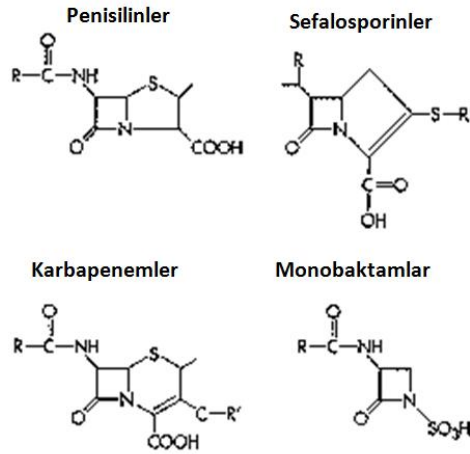
Çalışmamızda Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2009 - Aralık 2010 yılları arasında çeşitli bölümlerden gelen klinik örneklerden izole edilen *E.coli* kökenlerinde GSBL varlığının disk difüzyon tarama testi, kombine disk doğrulama testi ve otomatize sistem kullanılarak araştırılması ve alınan sonuçların karşılaştırılması, GSBL pozitif izolatlarda *bla*_{CTX-M} beta-laktamaz üretiminin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler

Günümüzde en yaygın kullanılan antibiyotik türüdür. Düşük toksisiteleri, yüksek bakterisid etkileri ve birçok infeksiyonun tedavisinde etkili olmaları bu grup antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılma nedenlerinden bazılarıdır. Dolayısıyla da bu yaygın kullanımları hızla gelişen direnç sorununu doğurmaktadır (Gür 2002).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, yapılarında beta-laktam halkası taşıyan, bu halkaya bağlanan farklı yan zincirler ile de gruplara ayrılan antibiyotiklerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Beta-laktam grubu antibiyotikler

Penisilinler, monobaktamlar, karbapenemler, sefalosporinler ve beta-laktamaz inhibitörleri olarak beş grupta toplanabilirler (Çolak 1999). Beta-laktam grubu antibiyotikler, bakterilerde peptidoglikan tabakanın sentezinden sorumlu stoplazmik membran üzerinde bulunan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak etki gösterirler. Peptidoglikan tabaka, mikroorganizmanın hücre duvar yapısının bütünlüğünü sağlar ve mikroorganizmayı ozmotik basınçtan korur. Beta-laktam antibiyotikler PBP'lere bağlanınca peptidoglikan sentezlenmez ve hücre duvar yapısı bozularak bakteri lizise uğrar (Kong ve ark. 2010).

2.2. Bakterilerde Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler, mikroorganizmalardan elde edilen, küçük dozlarda diğer mikroorganizmaları öldüren ve insan organizmasına zararlı etkisi görülmeyen doğal veya sentezlenmiş maddelerdir (Gülay 1999). Genellikle ürettikleri antibiyotiklere karşı dirençli olan bu mikroorganizmalar farklı antibiyotiklerden etkilenirler. Alexander Fleming tarafından 1929 yılında ilk antibiyotik olan penisilinin keşfi ile antibiyotik hayatımıza girmiş ve infeksiyon hastalıklarındaki başarısı ile de kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmıştır. Yaygınlaşan antibiyotik kullanımının doğal sonucu olarak direnç gelişimi de hızla artmıştır (Kong ve ark. 2010).

Günümüzde antibiyotiklere karşı direncin bu kadar hızlı gelişmesinin nedenlerinin en başında yaygın ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı gelmektedir. Ayrıca dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonlara bağlı ölüm oranlarındaki artışta sorunun önemini ortaya koymaktadır (Öztürk 2002).

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki bölümde incelenebilir.

2.2.1. Doğal Direnç

Bakterinin taşıdığı genetik özellikleri nedeniyle sahip olduğu dirençtir. Bu özellik sayesinde bakteri bazı antibiyotik türlerine karşı doğal olarak dirençlidir. Tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşımamaları veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşmasını önleyen doğal engeller bu tip dirençten sorumludur. Örneğin; ilacın dış membrandan geçememesi nedeniyle Gram negatif bakteriler vankomisine doğal olarak dirençlidirler (Yüce 2001).

2.2.2. Kazanılmış Direnç

Sonradan kazanılan direnç tipidir. Bakterinin genetik özelliklerindeki değişimler sonucunda, önceden duyarlı olduğu antimikrobiyal ajandan etkilenmemesidir. Günümüzde antimikrobiyal ajanlara karşı direnci sağlayan ana mekanizmadır (Gülay 1999).

2.2.2.1. Kromozomal Direnç

Bakteri kromozomunda kendiliğinden (spontan) oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Spontan mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerle oluşabilir ve sonuçta bakteri hücresinde yapısal değişimler oluşur. Böylece hücrenin ilaca permeabilitesi azalabilir veya hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olabilir (Yüce 2001). Klinikte bu tip direnç nadir görülür.

2.2.2.2. Plazmidlere Bağlı Direnç

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak çoğalabilen ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Klinikte görülen direncin ana sorumlusu plazmide bağlı dirençtir. Direnç plazmidleri (R-plazmidi) bir veya daha çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşımaktadır. Plazmid genleri genellikle ilaçları parçalayan enzimlerin üretilmesinden sorumludur (Öztürk 2002).

2.2.2.3. Transpozonlara Bağlı Direnç

Transpozonlar, bakteri kromozomunun değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmiden plazmide, plazmiden kromozomal DNA'ya, kromozoma veya bakteriyofaja aktarılabilen DNA dizileridir (Öztürk 2002). Özellikle çoklu ilaç direncinin ortaya çıkışında ve yayılışında transpozonların büyük rolü vardır.

2.3. Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi

Bakterilerde beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç dört yolla gelişebilir.

2.3.1. PBP'de Oluşan Değişiklikler ile Antibiyotiğin Hedefine Bağlanmasının Engellenmesi

Beta-laktam antibiyotiklerin hedefi, hücre zarında yer alan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayan protein (PBP) olarak adlandırılan enzimlerdir

(Yüce 2001). PBP'lerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe bağlanma özelliğinin azalması, PBP sentezinde azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük bağlanma özelliği gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir. Bunların tümü kromozomal mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. PBP değişimine bağlı direnç bazı Gram pozitif koklarda ve *Pseudomonas* spp.'de gözlenmektedir. Gram pozitif koklardan *Streptococcus pneumoniae* 'de gözlenen penisilin direnci ve *Staphylococcus aureus*'ta gözlenen metisilin direnci bu mekanizma ile oluşmaktadır (Gür 2002).

2.3.2. Dış Membran Proteinlerinde (OMP) Oluşan Değişiklikler ile İlacın Hücre İçine Girişinin Önlenmesi

Gram negatif bakterilerde beta-laktam molekülleri dış membran protein (OMP) adı verilen kanallardan geçerek periplazmik boşluğa ulaşırlar (Gür 2002). OMP'lerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (çözünürlük, büyüklük, yük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir. OMP eksikliği olan *Enterobacteriaceae* mutantları klinikte nadirdir (Gür 2002). Dış membranda bulunan OmpC ve OmpF beta-laktam antibiyotiklerinin hücreye giriş yoludur. Dolayısıyla bakteri OMP'lerinin yapısında meydana gelen değişiklikler birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gelişimine neden olabilmektedir.

2.3.3. Aktif Pompa Sistemi ile Antibiyotiğin Hücre Dışına Atımı

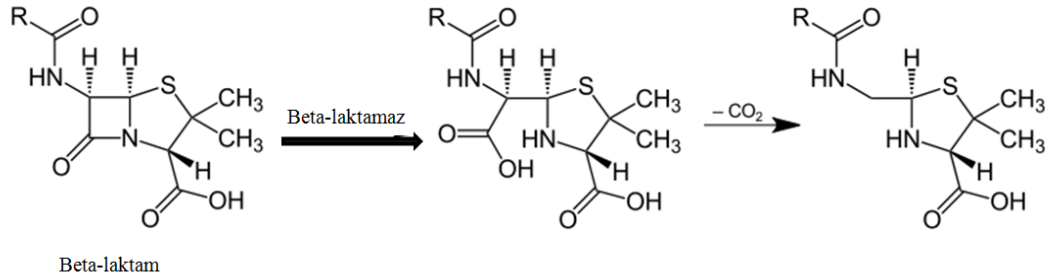
Bakterilerin beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktive eden enzimleri (beta-laktamaz) sentezlemeleri ile oluşan dirençtir. En sık rastlanan direnç tipidir. Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar genelde dış ortama salgılanırlar. Gram pozitif bakteriler içinde beta-laktamaz sentezleyen en önemli patojen *S. aureus*'tur. Stafilokokların beta-laktamazları plazmid kontrolündedir ve bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı bakterilere aktarılmaktadır. Gram negatif bakterilerde ise beta-laktamazlar, dış membran ile stoplazmik membran arasındaki periplazmik boşluğa salgılanmaktadır. Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimleri kromozom ya da plazmid kontrolünde sentezlenir. Membrana bağlı enzimler ender olarak bildirilmektedir (Gür 2002).

2.3.4. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi

Antimikrobiyal ajanın hücre içinde birikiminin engellenmesi ve dışarı atılmasıdır. Gram negatif mikroorganizmalardaki tetrasiklin direncinden genellikle bu mekanizma sorumludur. Bu direnç genellikle transpozon aracılı olsa da kromozom ve plazmid aracılı da olabilir (Kuyucu 2007).

2.3.5. Beta-laktamazlar

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnci sağlayan enzimlerdir. Zamanla çok sayıda beta-laktam antibiyotik kullanıma başlanmasıyla bu antibiyotikleri inaktive eden enzimler ortaya çıkmış ve sayıları giderek artmıştır. Gram negatif, Gram pozitif ve anaerob bakterilerce üretilmelerine karşın, beta-laktamaz sentezi başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncinin ana mekanizmasıdır (Pool 2004). Beta-laktam halkasındaki amid bağı parçalayarak beta-laktam ajanları inaktive ederler (Şekil 2.2). Penisilinler, 1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederler (Gülay 1999).



Şekil 2.2 Beta-laktamazın etki mekanizması

Beta-laktamazların isimlendirilmesi çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Örneğin; ilk izole edildikleri bakterilere göre (PSE, Pseudomonas), etkiledikleri substratlara göre (OXA, oksasilin), ilk izole edildikleri hastalara göre (TEM, Temoniera), biyokimyasal özelliklerine göre isimlendirilebilirler (SHV, sulphidryl hiper variable). Bunun gibi birkaç farklı özelliğe göre de isimlendirilebilirler (Gür 1997).

Kromozom, plazmid veya transpozon aracılığı ile sentezlenebilirler. Plazmid aracılığı ile sentezlenen ilk beta-laktamaz enzimi olan TEM-1, 1960'ların başında kan kültüründen izole edilen bir *E. coli* kökeninde saptanmıştır (Bradford 2001). TEM-1'in diğer bakterilerde transpozon ve plazmid aracılı sentezi yayılımını kolaylaştırmıştır. İzolasyonundan sonraki birkaç yıl içinde *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine ve *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria* gibi türlere yayılımı hızla artmıştır (Bradford 2001).

2.3.6. Beta-laktamazların Sınıflandırılması

Beta-laktamazların sınıflamasında sık karşılaşılan iki grupta vardır. Birincisi Ambler'in moleküler sınıflaması diğeri Bush-Jacoby-Medeiros'un fonksiyonel sınıflamasıdır (Bush ve ark. 1995). Ambler, beta-laktamazları moleküler yapılarındaki aminoasit ve nükleotid dizilerindeki benzerliklerini dikkate alarak A (öncelikli olarak penisilinleri hidrolize edenler. Örnek; TEM-1), B (aktivite gösterebilmeleri için çinkoya ihtiyaç duyan metallo enzimler), C (esas olarak sefalosporinaz aktivitesi gösterenler) ve D (oksasilinleri hidrolize eden enzimler) olmak üzere dört grupta toplamıştır. A, C ve D grubu beta-laktamazlar serin beta-laktamaz, B grubu beta-laktamazlar ise metallo beta-laktamazlardır (Ambler 1980).

Bush-Jacoby-Medeiros'un fonksiyonel gruplandırmasında ise bu enzimler substrat profillerine ve biyokimyasal özelliklerine göre dört temel grup ve alt gruplara ayrılmıştır (Bush ve ark. 1995). Bugün için en geçerli sınıflama budur.

Grup 1: Kromozomal beta-laktamazlardır. Moleküler grup C'de yer alırlar. Sefalosporinaz aktivitesi gösterirler. AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki (FOX-1, CMY-1, MOX-1 vb.) beta-laktamazlar da bu grupta yer almaktadır. Klavulonik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler. Karbapenemlere karşı duyarlıdırlar.

Grup 2: Bu grup substrat profillerindeki farklılıklar nedeniyle alt gruplara ayrılmıştır.

2a: Penisilini hidrolize eden enzimler bu gruptadır. Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Klavulonik aside duyarlıdırlar.

2b: Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eden enzimler bu gruptadır. Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Plazmid kontrolündeki, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları

bu gruptadır. Klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar.

2be: Bu grup TEM ve SHV türevi enzimlerden oluşur. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamlar üzerinde etkilidirler. Klavulonik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* kökenlerinde yaygındırlar.

2br: Klavulonik aside dirençli GSBL'ler bu gruptadır. Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Plazmid kökenlidirler.

2c: Karbenisilini hidrolize eden enzimler bu gruptadır. Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Klavulonik aside duyarlıdırlar.

2d: Oksasilini hidrolize eden enzimler bu grupta yer alır. Moleküler sınıf D'de yer alırlar. Klavulonik asit ve sulbaktama dirençlidirler. Plazmid kontrolünde sentezlenirler.

2e: Sefalosporinleri inhibe ederler. Klavulonik aside duyarlıdırlar. Moleküler sınıf A'da yer alırlar.

2f: Karbapenemleri hidrolize ederler. Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Klavulonik aside duyarlıdırlar.

Grup 3: Klavulonik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen metallo beta-laktamazlardır. Moleküler sınıf B'de yer alırlar. Çoğu beta-laktam grubu (Sefamisinler ve karbapenemler de dahil) antibiyotiğe dirençlidirler. EDTA ile inaktive olurlar.

Grup 4: Klavulonik asit ve diğer beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmayan penisilinaz grubundan oluşur. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir.

Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları

Bush-Medeiros-Jacoby Sistemi	Önemli Alt Gruplar	Ambler Sistemi	Belli Başlı Özellikler	Klavulonik Asit ile İnhibisyon
Grup I sefalosporinazlar (Serin beta-laktamazlar)	1	C	Genellikle kromozomal, karbapenemler dışında tüm beta-laktamlara dirençli	-
Grup II penisilinazlar (Serin beta-laktamazlar)	2a	A	Stafilokok penisilinazları	+
	2b	A	Geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2, SHV-1	+
	2be	A	Genişlemiş spektrumlu çoğunlukla TEM ve SHV çeşitleri, CTX-M	+
	2br	A	İnhibitörlere dirençli TEM 30 ile TEM-36, TRC-1	-/+
	2c	A	Karbenisilini hidroliz edenler, PSE-1, PSE-3, PSE-4	+
	2e	A	Sefalosporinazlar	+
	2f	A	Karbapenemazlar, NMC-A, IMI-1, GES-2, KPC-1	+
	2d	D (oksasilin hidrolizi)	Oksasilini hidroliz edenler (OXA), OXA-1 ile OXA-11, PSE-2(OXA-10)	-/+
Grup III (Metallo beta-laktamazlar)	3a	B	Çinko bağımlı karbapenamazlar	-
	3b	B		
	3c	B		
GrupIV	-	Sınıflanmamış	Birçoğu dizi analizi yapılmamış, çeşitli enzimler	-

2.3.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar

GSBL'ler; TEM ve SHV enzimlerinden çeşitli aminoasit değişiklikleri ile oluşan enzimlerdir. Geniş spektrumlu antibiyotikleri inhibe edebilme yeteneklerinden dolayı bu isimle adlandırılmışlardır. Bakteriyel direnci sağlayan beta-laktamazlar penisilinler, 1., 2., 3. kuşak sefalosporinler ve aztreonamı (sefamisin ya da karbapenem hariç) hidrolize ederken, klavulonik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine karşı ise aktivite gösteremezler (Patterson ve Bonomo 2005). Ambler sınıflamasında grup A, Bush-Jacoby-Medeiros'un fonksiyonel sınıflamasında grup 2be'de yer alırlar. En yaygın TEM ve SHV tip GSBL'lerin gözlendiği kökenler *K. pneumoniae* ve *E. coli*'dir. Ayrıca *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de bu enzimlere rastlanmıştır (Bradford 2001).

GSBL enzimleri aslında TEM ve SHV enzimlerinin türevleri olsalar da son zamanlarda bu enzimlerle çok benzer olmayan CTX-M, PER, VEB, TOHO vs. gibi genişlemiş spektrumlu, plazmid kaynaklı GSBL'ler tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler bütün sefalosporinlere karşı etkilidir (Bradford 2001).

2.3.6.1.1. TEM Grubu GSBL'ler

TEM grubu GSBL'ler Gram negatif bakterilerde en sık rastanan enzimlerdir. İlk TEM enzimi olan TEM-1, 1965 yılında Yunanistan'da bildirilmiştir (Datta ve Kontomichalou 1965). *E. coli*'lerde plazmid aracılıklı ampisilin direncinin %60'dan fazlasından sorumludur (Stürenberg ve Mack 2003). *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'de de ampisilin ve penisilin direncinden sorumlu enzimlerdir (Bradford 2001). Penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler, klavulonik asit ile inhibe olurlar. TEM-2, TEM-1'in ilk türevidir. TEM-1'in yapısındaki bir amino asit değişikliği ile ortaya çıkmıştır (Bradford 2001). TEM-1 ve TEM-2 dar spektrumlu enzimlerdir. GSBL fenotipini taşıyan ilk TEM enzimi 1989 yılında bildirilen TEM-3'tür (Sougakoff ve ark. 1988). GSBL'lerin fenotiplerindeki farklı aminoasit kombinasyonları; seftazidim, sefotaksim gibi spesifik oksimino-sefalosporinlerin hidrolizine neden olur (Bradford 2001). TEM tip beta-laktamazlar; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* gibi *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bu aileye dahil olmayan diğer Gram negatif bakterilerce de üretilirler.

2.3.6.1.2. SHV Grubu GSBL'ler

SHV-1 tip beta-laktamaza en çok *K. pneumoniae*'de rastlanır ve bu türün %20'den fazlasında plazmid kaynaklı ampisilin direncinden sorumludur (Tzouveleki ve Bonomo 1999). SHV tip beta-laktamazların TEM tip beta-laktamazlara kıyasla daha az türü vardır. SHV türevlerinin çoğunda GSBL fenotipi, 238. pozisyonda glisin yerine serin aminoasidi bulunmasıyla karakterizedir. Bu durum seftazidimin hidrolizinde önemlidir. SHV-5 türevinde ise 240. pozisyonda glutamat yerine lizin aminoasidi vardır, bu aminoasit varlığı ise sefotaksim hidrolizinde önemlidir (Bradford 2001).

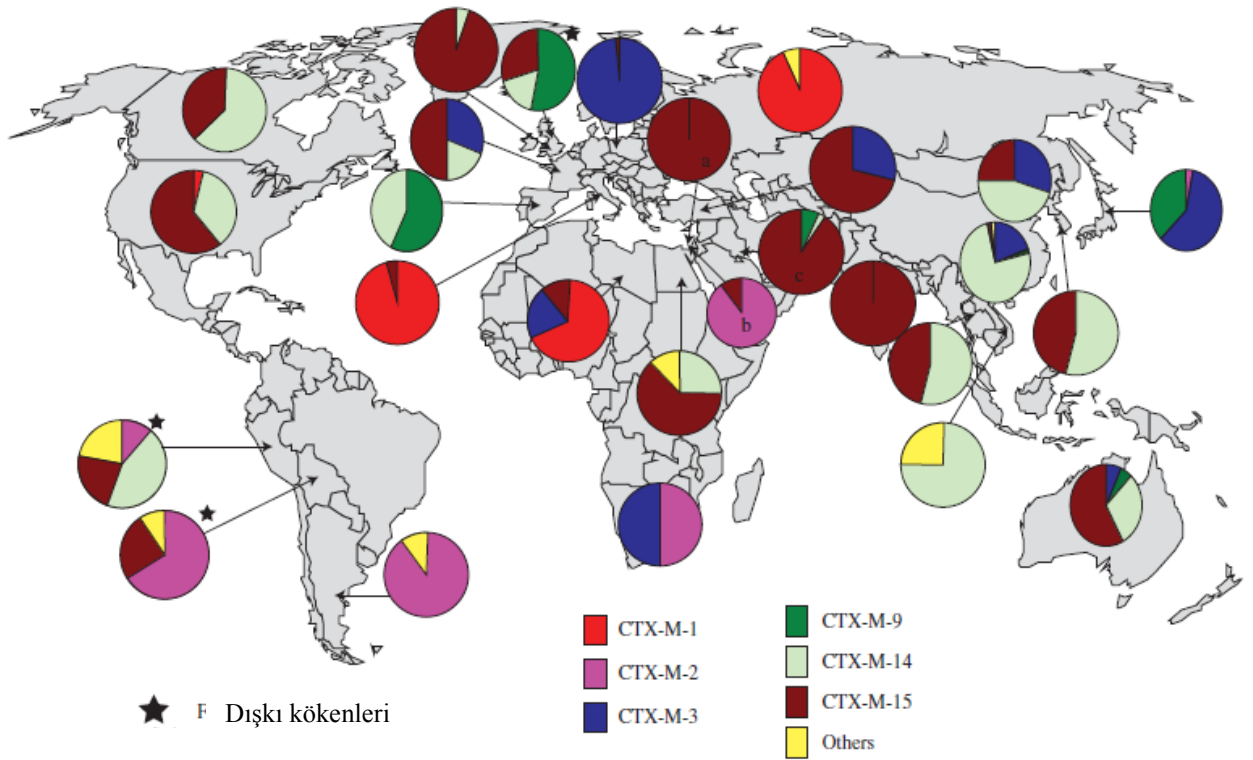
SHV türü enzimlerin genişlemiş spektrumlu ilk türü 1983 yılında Almanya'da (Knothe ve ark. 1983) *Klebsiella ozaenae*'de bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır.

Bu enzimler ampisilin, tikarsilin ve piperasiline dirençli, oksimino-sefalosporinlere karşı ise duyarlıdır (Gür 2005). SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir (Bradford 2001).

2.3.6.1.3. CTX-M Grubu GSBL'ler

GSBL ailesine son zamanlarda katılan gruptur. CTX-M beta-laktamazlar ilk kez 1986 yılında Matsumoto ve ark. (1988) tarafından beta-laktam antibiyotiklerin farmokokinetik çalışmaları sırasında deney hayvanı bir köpeğin gaita florasyndan izole edilen sefotaksime dirençli *E. coli* kökeninde FEC-1 enzimi olarak saptanmıştır. 1995'ten sonra Dünya'nın birçok yerinde ve bakteriler arasında dramatik olarak artmıştır (Bonnet 2004). Almanya'da 1989 yılında Bauernfeind ve ark. (1990) klinik olarak sefotaksime dirençli görünen *E. coli* kökeninde sefotaksime karşı hidrolitik aktivitesinden dolayı CTX-M-1 olarak isimlendirdikleri enzimi saptamışlardır. Aynı zamanlarda Güney Amerika'da sefotaksim dirençli *Salmonella* spp. kökenlerinin yayılımında büyük bir artış gözlenmiştir (Bauernfeind ve ark. 1992, Power ve ark. 1999). 1992 yılında, aynı tip GSBL klinik *E. coli* kökeninden izole edilmiş ve MEN olarak isimlendirilmiştir (Bernard ve ark. 1992). Barthélèmy ve ark. (1992) aynı yıl bu enzimi dizilemiş, TEM ve SHV enzimleri ile %39 oranında benzerlik gösteren bu enzimi MEN-1 olarak isimlendirmişlerdir. Bu dizileme, TEM ve SHV olmayan, plazmid ilişkili, sınıf A GSBL enziminin ilk dizilemesidir (Bonnet 2004). Ishii ve ark. (1995) Japonya'da izole edilen sefotaksim dirençli *E.coli* kökeni tarafından üretilen TOHO-1 olarak enzimi saptamışlardır. 1996 yılında yapılan iki genin

dizilemesi CTX-M-1'in MEN-1 ile aynı olduğunu ve 1990'da Arjantin'de izole edilen sefotaksime dirençli *Salmonella* spp. kökeninde CTX-M-2 olarak adlandırılan TOHO-1'in varyantı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Bauernfeind ve ark. 1996). Gniadkowski ve ark. (1998) 1996 yılında Polonya'da *Enterobacteriaceae* ailesinin farklı üyelerinden CTX-M-1'in bir varyantını izole etmişler ve CTX-M-3 olarak isimlendirmişlerdir. Bundan birkaç yıl sonra FEC-1 enzimini kodlayan genin dizilemesi FEC-1 enziminin CTX-M-3 enziminden sadece 2 peptidyle farklılık göstermektedir (Bonnet 2004). CTX-M enzimleri ortaya çıktıklarından beri hızla gelişerek dünyanın farklı bölgelerine yayılmışlardır. Doğal olarak beta-laktamlara direnç mekanizmalarının araştırılması ile *Kluyvera* cinsinin çevresel türlerinden de CTX-M tanımlanmıştır (Decousser ve ark. 2001, Humeniuk ve ark. 2002, Poirel ve ark. 2001). CTX-M enziminin dünyadaki dağılımı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 CTX-M enziminin dünyadaki dağılımı (Hawkey ve Jones 2009)

CTX-M tip beta-laktamazların 40'dan fazla tipi vardır (Bonnet 2004). CTX-M'lere en yakın beta-laktamazlar *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* ve *Citrobacter koseri* türlerinin kromozomal sınıf A enzimleridir. CTX-M enzimleri aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre sınıflandırılabilirler (Bonnet ve ark. 2000).

CTX-M enzimleri yapılan çalışmalara göre beş grupta toplanabilirler (Bonnet 2004).

Grup 1 (CTX-M-1); CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, FEC-1, -22, -23, -28, -29, -30

Grup 2 (CTX-M-2); CTX-M-2, -4, -4L, -5, -6, -7, -20, TOHO-1

Grup 3 (CTX-M-8); CTX-M-8

Grup 4 (CTX-M-9); CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, -21, -27, TOHO-2, -24

Grup 5 (CTX-M-25); CTX-M-25, -26

Kluyvera kökenlerinin doğal enzimleri ve kazanılmış CTX-M enzimleri arasındaki aminoasit dizilerindeki benzerlik, *K. georgiana* ve *K. ascorbata*'nın doğal beta-laktamazlarının CTX-M-2 ve CTX-M-8 gruplarının kökeni olabileceğini düşündürmektedir. Doğal CTX-M enzimi *K. cryocrescens*'den de tanımlanmıştır (Decousser ve ark. 2001).

Klinik kökenlerde CTX-M'leri kodlayan ve genellikle plazmidler de bulunan genler 7 kb-160 kb büyüklüğündedir (Cao ve ark. 2002, Kariuki ve ark. 2001, Pai ve ark. 2001). *bla*_{TEM-1} geni genellikle aynı plazmidde bulunur ve *bla*_{TEM-2}, *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{SHV} genleri ile ilişkilidir (Karim ve ark. 2001, Sabate ve ark. 2000). Bu plazmidler aminoglikozid, kloromfenikol, sülfonamid, trimetoprim ve tetrasiklinleri içeren antibiyotiklere karşı direnç genlerini de taşıyabilir. CTX-M kodlayan genler çoğu zaman *in vitro* ortamda konjugasyonla aktarılırlar.

Yapılan çalışmalar CTX-M kodlayan gen ekspresyonunun düzeyinin çok zayıf olduğu *Kluyvera* türlerindeki CTX-M beta-laktamazlar dışında diğerleri genellikle aminopenisilin (ampisilin ya da amoksisilin), karboksipenisilin (karbenisilin ya da tikarsilin), üreidopenisilin (piperasilin) ve dar spektrumlu sefalosporinlere (sefalotin, sefaloridin, sefuroksim) karşı yüksek düzey direnç sağladığını ortaya koymuştur. Sefoksitin ve karbapenemlere (imipenem ya da meropenem) duyarlılıkları değişmemiştir (Bonett 2004).

Birçoğu sefotaksim ve seftriakson gibi oksiminino sefalosporinlere yüksek, sefepim ve sefpiroma ise farklı düzeyde direnç sağlar. Aztreonam minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) seviyelerinde yüksektir. Beta-laktam/inhibitör kombinasyonuna karşı direnç düzeyi üretilen enzimin miktarına bağlıdır. Amoksisilin/klavulonik asit ve tikarsilin/klavulonik asit kombinasyonlarının MİK'leri düşüktür ve birçoğunda duyarlılık ya da düşük düzey direnç gözlenir (Bonett 2004).

TOHO-1 ve TOHO-2 enzimleri CTX-M tip beta-laktamazlarla yapısal ilişkilidirler. Bu enzimler de, çoğu CTX-M grubu enzimlerde olduğu gibi seftazidimden çok sefotaksime karşı yüksek hidrolitik aktiviteye sahiptirler (Paterson ve Bonomo 2005).

2.3.6.1.4. OXA Grubu GSBL'ler

GSBL'ler içinde büyüyen diğer bir gruptur. TEM ve SHV'den farklı olarak moleküler sınıf D'de (Ambler), fonksiyonel grup 2d (Bush-Jacoby-Medeiros) de yer alırlar. OXA tip beta-laktamazların, ampisilin ve sefalotine karşı direnç kazandırmaları, oksasilin ve kloksasiline karşı yüksek hidrolitik aktiviteleri ve klavulonik asit ile inhibe olmamaları önemli özelliklerindedir. Ancak OXA-18'in klavulonik asit ile inhibe olduğu bildirilmiştir. Genelde *P. aeruginosa*'da bulunsalar da *E. coli*, *K.pneumoniae* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde bu enzimlere rastlanır. Bazı OXA enzimleri OXA-10'un türevleridir (OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17). OXA-10'un türevi olan bu enzimler iki aminoasit yapısındaki değişiklik ile oluşmuşlardır. Bunlardan ilki 73. pozisyonda serin yerine asparajinin, ikincisi ise 157. pozisyonda glisin yerine aspartatın gelmesidir. 157. pozisyondaki aminoasit değişikliğinin seftazidim direncinde önemli olduğu düşünülmektedir (Danel ve ark. 1999). Son zamanlarda OXA-20, OXA-2, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27 ve OXA-30 gibi yeni tanımlanan OXA türevi bazı enzimlerin GSBL'lerle ilişkili olup olmadığı henüz açıklanmamıştır. Türkiye ve Fransa'da OXA ailesine ait yeni üyeler saptanmıştır (Bradford 2001).

2.3.6.1.5. Diğer GSBL'ler

GSBL'lerin büyük kısmı TEM ve SHV'den köken almış enzimler olsalar da bu enzimlerle çokta benzer olmayan gruplarda vardır. PER-1 ilk kez 1993'te Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa*'da saptanmıştır (Nordmann ve ark. 1993). TEM ve SHV ile %27 oranında benzerdir. Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize edebilirler ancak klavulonik asite duyarlıdırlar (Paterson ve Bonomo 2005). Daha sonra *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Salmonella enterica* serovarlari ve *Acinetobacter baumannii* türlerinde de bu enzime rastlanmıştır (Bradford 2001). Türkiye'de oldukça yaygın olan bu enzim genellikle plazmid kaynaklıdır. Arjantin'de *S. enterica* serovar *Typhimurium* ve

S. enterica serovarlarında saptanan ve PER-2 olarak isimlendirilen başka bir enzim PER-1'in türevidir ve bu iki enzim arasında %86 oranında aminoasit benzerliği görülür (Bauernfeind ve ark. 1996). İlginç olan PER-1 Türkiye'de sıklıkla izole edilirken, türevi olan PER-2'ye Güney Amerika'da rastlanmaktadır (Paterson ve Bonomo 2005). PER-1 ve PER-2 ile ilişkili olan diğer bir enzim VEB-1'dir. Plazmid ilişkili bir enzimdir. Tayland'da *P. aeruginosa*'dan, Vietnam'da *E. coli*'den izole edilmiştir (Naas ve ark. 1999). CME-1, *Chryseobacterium meningosepticum*'dan izole edilmiştir (Bradford 2001). TLA-1, Meksika'da *E. coli*'den izole edilmiştir (Rossolini ve ark. 1999). Bu enzimler birbirleriyle ilişkili olsalar da sadece %40-50 oranında benzerlik gösterirler. Hepsi başta aztreonam ve seftazidim olmak üzere oksiminino-sefalosporinlere karşı dirençlidirler. *Bacteroides* spp.'nin kromozomal sefalosporinazlarıyla bazı benzerlikleri vardır ve bunlardan köken aldıkları düşünülmektedir (Rossolini ve ark. 1999).

2.3.7. GSBL'lerin Klinik Önemi

Hastane infeksiyonlarında GSBL üretimi dünya genelinde büyük bir sorun haline gelmiştir. GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyon hastalıklarının sefalosporinlerle tedavisinde, organizma antibiyotiğe *in vitro* duyarlı görünse bile yeterli klinik sonuçlar alınamamıştır (Paterson ve ark. 2001). Ayrıca GSBL üreten izolatların, florokinolon ve aminoglikozid gibi diğer sınıf antibiyotiklere karşı da direnç geliştirebildikleri saptanmıştır (Paterson ve ark. 2004). GSBL'lerin neden olduğu ilk nozokomiyal salgın 1985 yılında Fransa'da, 1980'lerin sonunda ve 1990'ların başında Amerika'da bildirilmiştir (Sirot ve ark. 1987).

Enterobacteriaceae ailesinin GSBL üreten üyeleri, tüm sefalosporinlere, monobaktam ve aztreonamıda içeren genişlemiş spektrumlu penisilinlere dirençlidir. Sefamisinler (sefoksitin, sefotetan gibi) GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'lerde kullanılabilir. Her nasılsa sefamisinler plazmid ilişkili AmpC direncinin ortaya çıkışına önderlik etmişlerdir. Bu enzimler filogenetik olarak GSBL ailesinden çok farklıdırlar ve sefamisin gibi 3. kuşak sefalosporinlere dirençlidirler. GSBL'ler genellikle beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına duyarlıdırlar, ancak özellikle fazla miktarda enzimden etkilenirler ve bu *in vivo* direnci gösterir. Hayvan modelinde beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyon tedavisi imipenem veya

piperasilin/tazobaktam ve aminoglikozid kombinasyonu tedavisinden daha başarısızdır. Karbapenemler hala GSBL üreten mikroorganizmalara karşı önemli bir ilaçtır. Ancak bakteriler arasında metallo beta-laktamaz (MBL) üretimi karbapenemlerin etkisini azaltmaktadır. Yakın zamanda yeni ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

Doğru infeksiyon kontrol uygulamaları GSBL üreten bakteri salgınları ve yayılımının engellenmesinde önemlidir. Gastrointestinal sistem, orofarinks, yara ve idrar yolu infeksiyonları bu bakterilerin gözlendiği rezarvuarlardır. Kolonize eller, ekipmanlar hastalar arasında infeksiyonun yayılmasına sebep olabilir. Bu yüzden ellerin yıkanması, kolonize/infeksiyonlu hastaların izolasyonu ve bariyer önlemleri zorunlu infeksiyon kontrol uygulamalarıdır. Ayrıca hastanın gözetim altında olması GSBL üretiminin erken tanı ve kontrolüne yardımcı olur.

GSBL sentezleyen *E.coli* ve *Klebsiella* kökenleri çoğunlukla birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından bu mikroorganizmalar ile gelişen infeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Buna karşın bu tip infeksiyonlarda farklı antibiyotiklerin etkinliğini araştıran kontrollü, randomize klinik araştırmalar yoktur ve çeşitli nedenlerden ötürü de yapılması güçtür (Stürenburg ve Mack 2003). GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı birçok epidemi bildirilmiş ve GSBL üretiminin klinik yanıtı olumsuz etkilediği ve GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı bakteriyemilerde mortalitenin arttığı farklı araştırmalarda gösterilmiştir (Rahall 2000). Bu araştırmalar çoğunlukla retrospektif verilere dayanmaktadır. Çok merkezli prospektif bir çalışmada GSBL üreten *K. pneumoniae* ile gelişen bakteriyemilerde antibiyotik seçiminin çok önemli olduğu ve GSBL üreten *K. pneumoniae*'ye etkili antibiyotik kullanılmadığında mortalitenin çok arttığı, bakteriyeminin başlangıcından itibaren ilk beş gün içinde uygulanan karbapenemin *in vitro* olarak aktif görünen diğer antibiyotiklere kıyasla mortaliteyi önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Paterson ve ark. 2004). Diğer retrospektif bir araştırmada ise GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ye bağlı bakteriyemilerde sefalosporin kullanıldığında tedavi başarısının düşük olduğu ve en etkili antibiyotiklerin siprofloksasin ve karbapenemler olduğu gözlenmiştir. Buna karşın ampirik tedaviye uygun antibiyotik ile başlanmasa bile duyarlılık test sonuçlarına göre uygun antibiyotiğe geçildiğinde mortalitede bir fark olmadığı gözlenmiştir (Kang ve ark. 2004).

2.3.8. GSBL Tanı Yöntemleri

Enterobacteriaceae ailesinde GSBL üretimindeki artış, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığının doğru bir şekilde tanımlanması için gerekli laboratuvar testlerine ihtiyacı ortaya çıkarmıştır (Bradford 2001).

GSBL saptamak için birçok test kullanılmaktadır. İlk test Jarlier ve ark. (1988) tarafından tarif edilen çift disk yöntemidir. Bu yöntem GSBL saptamak için hala güvenilirdir.

GSBL'ler bir ya da daha fazla oksimino beta-laktam antibiyotiğe direnç sağlamalarına rağmen, beta-laktamazlar Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) yorumlama kriterlerine göre dirençli olarak kabul edilebilecek yüksek MİK seviyelerine her zaman ulaşamazlar (Katsanis ve ark. 1994). Sefalosporin ile GSBL tanımlanmasında, testin duyarlılık ve özgüllüğü değişkenlik gösterir. Sefpodsoksim ile gerçekleştirilen disk difüzyon ve dilüsyon duyarlılık testlerinin her ikisinde de seftazidim, sefotaksim, seftriakson gibi diğer sefalosporinlere göre daha çok GSBL pozitifliği saptanmıştır (Emery ve Weymouth 1997). CLSI halen test prosedürleri ve yorumlama kriterlerini tekrarlayarak değerlendirmektedir (Bradford 2001). *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinde GSBL varlığının doğru olarak saptanmasında MİK ya da disk testlerinin yetersizliği bildirilmiştir (Emery ve Weymouth 1997).

GSBL saptanmasında kullanılan geleneksel duyarlılık testlerinin hassasiyet ve özgüllüğündeki yetersizlikler, klinik izolatlardan bu enzimlerin kesin olarak tespitini sağlayan yeni laboratuvar testlerine gereksinimi ortaya çıkarmıştır. Yıllar içerisinde yeni metodlar geliştirilmiştir.

GSBL saptama yöntemleri tarama testleri ve doğrulama testleri olmak üzere iki grupta incelenebilir.

2.3.8.1. GSBL Tarama Testleri

2.3.8.1.1. Disk Difüzyon Tarama Testi

CLSI *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Proteus mirabilis* türlerinde GSBL üretiminin taranmasında disk difüzyon tarama testini önermektedir (CLSI 2011). Bu amaçla sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ya da seftriakson diskleri kullanılır. Sefpodoksim ile yapılan disk difüzyon yönteminin GSBL üreten ve üretmeyen *K. pneumoniae* ve *E. coli*'leri ayırmada güvenilir olduğu bildirilmiştir (Thomson ve Sanders 1997). CLSI GSBL'yi saptamak için 10 µg sefpodoksim ile yapılan testi uygun tarama testi olarak önermektedir (CLSI 2011). Sefpodoksim zonu ≤17 mm olan kökenler fenotipik GSBL doğrulama testi ile doğrulanmalıdır.

2.3.8.1.2. Antimikrobiyal Dilüsyon Duyarlılık Testi

Seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson 1 µg/ml yoğunluğunda kullanılır (CLSI 2011). Bu antibiyotik yoğunluğunda üreme sefalosporin için MİK değerinin (≥2 µg/ml olması) GSBL üretimi için şüphelidir ve fenotipik GSBL doğrulama testi ile doğrulanmalıdır. Bununla birlikte Oliver ve ark. (2002) sefpodoksim için MİK değeri 2 veya 4 µg/ml olan 59 kökenin hiçbirinin GSBL üretmediğini saptamıştır. Sefpodoksime duyarlılığın azalmasının en yaygın mekanizması TEM-1 beta-laktamaz üretimi ile ilgili olarak major protein porlarının kaybı ya da değişimi bazende AmpC kromozomal beta-laktamaz üretiminin artmasının eklenmesidir. Bazı kökenlerin OXA-30 beta-laktamaz ürettiği belirtilmiştir. Böylece klinik sefpodoksim tarama testi olarak sefpodoksim MİK değerinin ≥8 µg/ml olması fenotipik GSBL doğrulama testi için bir kriter olarak kabul edilmiştir (CLSI 2011).

2.3.8.2. GSBL Fenotipik Doğrulama Testleri

2.3.8.2.1. Sefalosporin/Klavulonik asit kombinasyon diskleri

CLSI GSBL varlığının fenotipik doğrulaması için Mueller Hinton agarda klavulonik asitli (10 µg) ya da klavulonik asitsiz sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerinin kullanımını önermektedir (CLSI 2011). Sefalosporin diski ve sefalosporin/klavulonik asit diski zon çapları arasında ≥ 5 mm'lik fark olması GSBL üretimini doğrulamaktadır.

2.3.8.2.2. Broth Mikrodilüsyon

Fenotipik doğrulama broth mikrodilüsyon testi seftazidim (0.25-128 µg/ml), seftazidim/klavulonik asit (0.25/4-128/4 µg/ml), sefotaksim (0.25-64 µg/ml) ve sefotaksim/klavulonik asit (0.25/4-64/4 µg/ml) kullanılarak yapılır. Sefalosporin /klavulonik asit kombinasyonu ile yapılan sadece sefalosporinle yapılan teste göre MİK değerinde ≥ 3 dilüsyonluk azalma fenotipik olarak GSBL varlığını doğrular (CLSI 2011).

Tarama ve fenotipik doğrulama testlerinde kalite kontrol için GSBL üretmeyen *E.coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 GSBL üreten *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılmalıdır.

CLSI (2011) kriterlerine göre fenotipik doğrulama testi pozitif olan kökenler için sefamisin, sefoksitin ve sefotetan dışındaki bütün sefalosporinler ve aztreonam MİK değerlerine bakılmaksızın dirençli olarak klinisyene bildirilmelidir. Penisilinler de MİK değerlerine bakılmaksızın dirençli olarak klinisyene bildirilmelidir, fakat beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonu ile MİK veya zon çapı uygun sınırlar içinde ise duyarlı olarak bildirilmelidir (CLSI 2011).

2.3.8.3. GSBL Saptanmasında Diğer Metodlar

2.3.8.3.1. İso-Sensitest Agarda Sefalosporin/Klavulonik Asit Kombinasyon Diskleri

İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) fenotipik doğrulama için seftazidim/klavulonik asit ve sefotaksim/klavulonik asit disklerinin kullanıldığı Iso-Sensitest agarda yapılan disk difüzyon yöntemini önermektedir. M'Zali ve ark. (2000) bu yöntemle sefalosporin ve sefalosporin/klavulonik asit zon çaplarını değerlendirmiş ve sefalosporin/klavulonik asit zon çapının sefalosporin zon çapına bölerek oranı hesaplamışlardır. Bulunan 1.5 ve daha fazla oran GSBL varlığını göstermektedir. Seftazidim içeren diskler kullanılarak yapıldığında bu yöntemin duyarlılığı %86, sefotaksim içeren diskler kullanılarak yapıldığında %65.5'tir. SHV-6 üreten kökenleri bu test saptamamıştır.

2.3.8.3.2. Çift Disk Sinerji Testi

Fransız araştırmacılar 1980'lerin sonlarında disk difüzyon testini tarif etmişlerdir (Brun-Buisson ve ark. 1987, Jarlier ve ark. 1988). Agar besiyerinde amoksisilin/klavulonik asit (20 µg/10 µg) diski, seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve aztreonam disklerinin 30 mm uzağına yerleştirilir. Sefotaksim inhibisyon zonunun klavulonik asit içeren disk tarafında uzaması sinerji olarak değerlendirilir ve GSBL varlığını gösterir. Bu yöntemde duyarlılık %79-97, özgülük %94-100 arasında değişmektedir. Bu testin teknik olarak kolay olması en büyük avantajıdır. Bununla birlikte testin yorumlanması subjektiftir (Paterson ve Bonomo 2005).

2.3.8.3.3. Klavulonik asit Eklenmiş Agar

Ho ve ark. (1998) 4 µg/ml klavulonik asit eklenmiş MHA kullanılarak yapılan bir yöntem tarif etmişlerdir. Seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30µg) ve aztreonam (30 µg) klavulonik asit içeren agara ve klavulonik asit içermeyen MHA yerleştirilir. Her iki besiyerindeki ≥10 mm beta-laktam zonundaki fark pozitif GSBL üretimi olarak değerlendirilir. Seftazidim diski zonundaki değişimlerin duyarlılığı %93-96,

özgüllüğü 100 olarak bulunmuştur (Ho ve ark. 1998). Bu yöntemin dezavantajı klavulonik asitin etkinliği 72 saatten sonra düşmektedir, klavulonik asit içeren agarlar kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır.

2.3.8.3.4. Disk Replasman Yöntemi

Bu yöntem Casals ve Pringler (1990) tarafından tarif edilmiştir. Üç amoksisilin/klavulonik asit diski test edilecek mikroorganizmanın ekildiği MHA yerleştirilir. Oda ısısında bir saat bekletildikten sonra diskler çıkarılır ve aynı yerlere sefotaksim, seftazidim ve aztreonam içeren diskler yerleştirilir. Bu üç antibiyotiği içeren kontrol diskleri de en az 30 mm uzaklığa yerleştirilir. Amoksisilin/klavulonik asit disklerinin yerine yerleştirilen disklerin çevresindeki zonların diğer kontrol disklerin çevresindeki zonlara göre ≥ 5 mm olması GSBL üretiminin varlığını gösterir. Bir saat sonra ikinci bir aşamanın uygulandığı bu yöntem iş yükü çok olan klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için uygun değildir.

2.3.8.3.5. Üç-boyutlu Test

Üç boyutlu test beta-laktamaz inhibitörü ile beta-laktamların inaktivasyonunun gösterilmediği geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonamın GSBL ile indüklenen inaktivasyonunu fenotipik olarak gösteren bir testtir. Thomson tarafından geliştirilmiştir (Thomson ve Sanders 1992). MHA besiyerine 10^8 cfu/ml bakteri süspansiyonundan yüzeyel ekim yapılır. Daha sonra petri plağının ortasına yakın tarafta ve kullanılacak antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire şeklinde kesilir. Ardından 3 boyutlu yöntem için hazırlanan süspansiyondan (10^9 - 10^{10} cfu/ml) steril otomatik pipetle 200 µl alınarak, kesilen besiyeri çizgisi doldurulur. Her iki inokülasyon yapıldıktan sonra seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve aztreonam (30 µg) diskleri yerleştirilir ve plaklar 35 °C'de 18-20 saat inkübe edilir. Aztreonam, seftazidim ve sefotaksime ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma, kesintiye uğraması veya kökenin inoküle edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi, antibiyotiğin yoğun inokülasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini gösterir ve GSBL olumlu olarak değerlendirilir.

Testin dezavantajı inhibisyon zonları yoksa ya da küçükse ek olarak indirek teste ihtiyaç vardır. İndirek test *E. coli* ATCC 25922 gibi tamamen duyarlı olan bir köken agar yüzeyine ekilerek yapılır. Daha sonra daire şeklinde kesilen kısma test edilecek köken ekilir. İndirek test ve üç boyutlu test, çift disk difüzyon testine göre daha duyarlıdır (Thomson ve Sanders 1992, Vercauteren ve ark. 1997).

2.3.8.3.6. GSBL İçin E Test

Seftazidim (0.5-32 µg/ml) ve seftazidim/klavulonik asit (0.5/4-32/4 µg/ml), sefotaksim (0.25-16 µg/ml) ve sefotaksim/klavulonik asit (0.016/4-1/4 µg/ml) içeren E testler kullanılır. Bu yöntem hem tarama hem de fenotipik doğrulama için kullanılabilir. Fenotipik doğrulama testi olarak duyarlılığı %87-100, özgüllüğü %95-100'dür (Cormican ve ark. 1996, Ho ve ark. 1998, Vercauteren ve ark. 1997). Sefalosporin/klavulonik asit içeren E testte saptanan MİK değerinde sadece sefalosporin içeren E testte saptanan MİK değerine göre ≥ 8 kat azalma GSBL üretimini doğrular.

2.3.8.3.7. Vitek GSBL Kartları

Vitek GSBL test (BioMerieux, Fransa) sefotaksim ve seftazidim (0.5 µg/ml) tek başına ve klavulonik asit (4 µg/ml) ile kombinasyonlarını kullanarak otomatik olarak GSBL tayinini yapmaktadır. Bu metodun duyarlılık ve özgüllüğü %90'ı geçmektedir (Sanders ve ark. 1996). *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli* dışındaki türlerde GSBL üretimini saptamada güvenilirliği bilinmemektedir.

Yukarıda anlatılan yöntemlerin olumlu ve olumsuz özellikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri (Gür, 2005)

Klinik Mikrobiyoloji Test	Olumlu Özellikleri	Olumsuz Özellikleri
Standart CLSI Kriterleri (Antibiyotik duyarlılık testleri)	Kullanımı kolay, her laboratuarda uygulanabilir	GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir
CLSI GSBL doğrulama testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılık seçilen oksiiimino-sefalosporinlere göre değişir
Çift-disk sinerji testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Uygulanan diskler arasındaki mesafe standart değil
Üç boyutlu test	Duyarlı, yorumu kolay	GSBL için özgül değil, emek yoğun
E-test GSBL şeritleri	Kullanımı kolay	Yorum her zaman kolay değil, çift-disk sinerji testi kadar duyarlı değil
Vitek GSBL testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılığı düşük

2.3.8.3.8. Moleküler Saptama Yöntemleri

Moleküler saptama yöntemleri GSBL varlığını tanımlamak için yapılan testlerdir. Klinik izolatlarda bulunan spesifik GSBL'nin tanımlanması daha karışıktır. GSBL'nin tanımlanması için izoelektrik noktanın saptanması genellikle yeterlidir (Bradford, 2001). Bununla birlikte 90'dan fazla TEM tipi beta-laktamaz identik izoelektrik noktaya sahip olduğu için GSBL'yi izoelektrik nokta ile belirlemek mümkün değildir. SHV, CTX-M ve OXA ailelerinde de benzer durumlar vardır. TEM ve SHV enzimleri için spesifik olan DNA probları kullanılarak beta-laktamaz genleri önceden saptanabilir. Ancak harcanacak emek fazladır. Beta-laktamaz varlığını saptamada en kolay ve en sık kullanılan moleküler yöntem beta-laktamaz geni için spesifik oligonükleotid primerleri ile yapılan PZR'dır (Bradford 2001). Bu yöntem de TEM ve SHV tiplerini ayıramaz.

Beta-laktamaz identifikasyonunda, oligotipleme yöntemi ilk moleküler yöntemdir, TEM-1 ve TEM-2 arasında ayırım yapabilen oligotipleme yöntemi Ouellette ve ark (1988) tarafından geliştirilmiştir. Oligonükleotid probların kullanıldığı bu yöntem nokta mutasyonlarını saptamak için tasarlanmıştır.

TEM beta-laktamaz genin moleküler olarak belirlenmesinde PZR'dan başka diğer bir yöntem PZR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizidir. Bu testte, amplifiye PZR ürünleri bazı restriksiyon endonükleazlarla kesilir ve sonra fragmanlar

elektroforezle ayrılır. Her bir restriksiyon enziminin kestiği fragmanların büyüklüğü *bla_{TEM}*'in yapısal geninde bulunan nokta mutasyonlarını ortaya çıkarır.

SHV'leri saptama ve tanımlamada birçok farklı test önerilmiştir. Bu testlerden önerilen en basit test, PZR-RFLP' dir. Bu yöntem GSBL' de mevcut SHV tipini tanımlayamazken, 238. pozisyonadaki spesifik mutasyonu belirler.

SHV tipi GSBL'leri tespit eden bir diğer yöntem PZR-SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism)'dir. Bu yöntem *bla_{SHV}* genindeki spesifik bölgedeki tek baz mutasyonunun belirlenmesinde kullanılır. PZR-SSCP ile PCR-RFLP'nin birlikte kullanılması 17 farklı SHV geninin tanımlanmasını sağlar.

SHV genlerini tanımlamada diğer bir yöntem LCR (Ligase Chain Reaction)'dır. Dört oligonükleotid primeri ile termostabil ligaz kullanılarak tek baz çifti ile ayrılan DNA dizilerinin ayrımının yapılabildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde *bla_{SHV}* geni içeren hedef DNA termal döngü cihazında denatüre edilir ve biotin bağlanmış oligonükleotid primerleri ile bağlanarak dört pozisyonda mutasyon belirlenir.

Nükleotid dizi analizi spesifik beta-laktamaz geninin saptanmasında altın standart olarak kalmıştır. Yoğun emek gerektirir ve teknik olarak zordur. Kullanılan yöntemle ilgili olarak farklı sonuçlar çıkabileceğinden yorumlaması zor olabilir.

Çizelge 2.3'de kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 GSBL'lerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler, olumlu ve olumsuz özellikleri (Gür, 2005)

Moleküler Yöntem	Olumlu Özellikleri	Olumsuz Özellikleri
DNA Probları	Gen ailesi için özgül (örn; TEM veya SHV)	Emek yoğun, genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırt etmez
PZR	Kolay uygulanır, gen ailesi için özgüldür (örn; TEM veya SHV)	Genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, TEM veya SHV türevlerini ayırt etmez
Oligotiplendirme	Özgül TEM türlerini saptar	Özgül oligonükleotid problemleri gerektirir, emek yoğunudur, yeni türevleri saptayamaz
PZR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Kolay uygulanır, nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir	Saptanabilmesi için nükleotid değişikliklerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gerekir
PZR- SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism)	Çeşitli SHV türevlerini ayırdedebilir	Özel elektroforez koşullarını gerektirir
LCR (Ligase Chain Reaction)	Çeşitli SHV türevlerini ayırdedebilir	Çok sayıda oligonükleotid primerine gereksinim gösterir
Nükleotid dizi analizi	Altın standarttır, tüm türevleri saptayabilir	Emek yoğun, teknik olarak zor olabilir, manuel yöntemleri yorumlamak güç olabilir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Kökenleri

Ocak 2009-Aralık 2010 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji bölümüne gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve GSBL enzimi ürettiği Vitek 2 otomatize sistem (BioMérieux, Fransa) ile saptanmış olan 100 *E. coli* ve GSBL enzimi üretmeyen 50 *E. coli* kökeni çalışmaya dahil edildi. Kökenler izole edildikten sonra %20 gliserin içeren Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine ekilerek derin dondurucuda (-70°C'de) saklandı. Çalışılacağı zaman izolatların Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (BioMérieux, Fransa) besiyerine ardışık günlerde iki kez pasajları yapıldı.

3.2. Bakterilerin Klinik Örneklerden İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

E. coli kökenlerinin tanımlanmasında EMB agarda karakteristik koloni görünümü, oksidaz enziminin olmaması, glukoza, laktoz ve sukroza fermente etmesi, lizin dekarboksilaz enziminin varlığı, indol üretiminin pozitif olması, üreaz enziminin olmaması, sitratı kullanamaması, metil kırmızısı reaksiyonunun pozitif, Voges Proskauer reaksiyonunun negatif olması ve hareketli olması özellikleri araştırıldı. Gerekğinde kökenlerin tanımlanması Vitek 2 otomatize sistem (BioMérieux, Fransa) ile doğrulandı. Tüm kökenlerin antimikrobiyal duyarlılıkları Vitek 2 otomatize sistem ile yapıldı. İzolatların tigesiklin dışındaki antibiyotiklere olan duyarlılıkları CLSI (2011) kriterlerine göre cihaz tarafından yorumlanarak elde edildi. CLSI (2011)'de tigesiklin eşik değerleri belirtilmediğinden Food and Drug Administration (FDA) tarafından bildirilen kriterlere göre değerlendirme yapıldı. Sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime karşı duyarlılıklar GSBL tarama testi yapılırken disk zonları ölçülerek CLSI (2011)'e göre değerlendirildi.

3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

3.3.1. Kanlı Agar (BioMérieux, Fransa)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 40 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 70 ml koyun kanı eklenerek steril petrilere dağıtıldı.

3.3.2. EMB Agar (BioMérieux, Fransa)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 36 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri steril petrilere dağıtıldı.

3.3.3 Sitrat Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 22.5 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.4. Mueller-Hinton Agar Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 34 g tartılıp, 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri steril petrilere dağıtıldı.

3.3.5. Üre Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 21 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.6. Lysine İron Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 32 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.7. Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 30 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 250 ml gliserin eklendi. Steril ependorflara 1 ml dağıtıldı.

3.3.8. Triple Sugar Iron Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 32 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.9. Voges-Proskauer Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 17 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.10. Mueller Hinton Broth Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 21 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.11. Haraket Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 30 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildikten sonra, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril cam tüplere 10-12 ml dağıtıldı.

3.3.12. Kovack's Ayıracı (GBL, Türkiye)

Ticari olarak temin edilen ayıraç kullanıldı.

3.3.13. Metil Kırmızısı Ayıracı (GBL, Türkiye)

Ticari olarak temin edilen ayıraç kullanıldı.

3.3.14. Fosfat Tamponlu Su (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlandı

Kimyasal maddeler distile su içinde eritildikten sonra pH 8.3'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.3.15. Di-etil-piro-karbonat solüsyonu (DEPC)

DEPC	1 ml
Distile su	100 ml

100 ml distile suya 1 ml DEPC eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. Oda ısısında 6 saat, su banyosunda 60°C'de 2 saat bekletildi ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.3.16. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

SDS 10 g

Distile su 500 ml tamamlandı

Sodyum dodesil sülfattan 10 g tartılıp 450 ml distile su içinde karıştırıldı. Su banyosunda 70°C' de 2 saat bekletildi ve hacim 500 ml'ye tamamlandı. 1N HCl ile pH'sı 7.2'ye ayarlandı.

3.3.17. Tris Borate EDTA Buffer (TBE) (10X)

Trisma Base 108 g

Borik Asit 55 g

0.5 M EDTA 40 ml

Distile Su 1000 ml'ye tamamlandı

Kimyasal maddeler distile su içinde iyice çözdürüldükten sonra pH 8.3'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.3.18. TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

Trisma base 315.12 mg

EDTA 58.4 mg

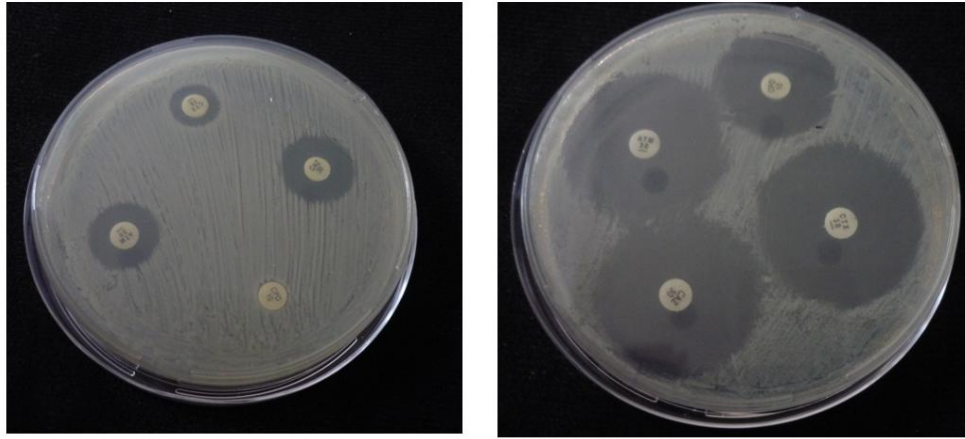
Distile su 1000 ml'ye tamamlandı

Kimyasal maddeler distile su içerisinde iyice çözdürüldükten sonra pH 8'e ayarlandı ve otoklavda sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

3.4. GSBL Disk Difüzyon Tarama Testi (DDTT)

Kökenlerin EMB agar besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden 4-5 koloni alınıp Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerine ekilerek 37 °C'de 2-3 saat inkübe edildi. Bakteri süspansiyonları 0.5 Mc Farland bulanıklığına ayarlandı ve eküvyon yardımı ile MHA besiyeri üzerine her tarafa eşit olacak şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kurumasını takiben CLSI (2011) kriterlerine göre disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, sefpodoksim (10 µg) (Oxoid, İngiltere), aztreonam (30 µg) (Oxoid,

İngiltere), seftazidim (30 µg) (Oxoid, İngiltere), sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri penset yardımıyla steril bir şekilde yerleştirildi ve 37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. Sefpodoksim (10 µg) zonu ≤17 mm, seftazidim (30 µg) zonu ≤22 mm, aztreonam (30 µg) zonu ≤27 mm, sefotaksim (30 µg) zonu ≤27 mm olan kökenler GSBL pozitif kabul edildi (Şekil 3.1).



A (GSBL pozitif)

B (GSBL negatif)

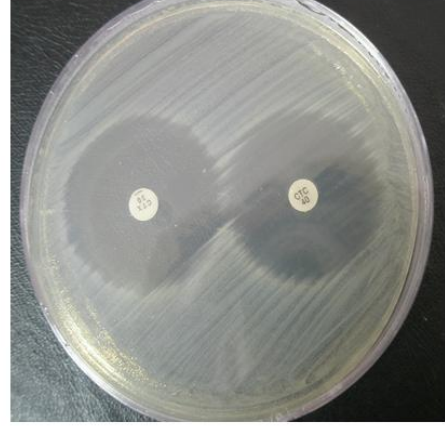
Şekil 3.1 GSBL disk difüzyon tarama testi

3.5. GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (KDDT)

Disk difüzyon testi için bakteri süspansiyonları 0.5 Mc Farland bulanıklığına ayarlandı ve eküvyon yardımı ile MHA besiyeri yüzeyine her tarafa eşit dağılacak şekilde yayıldı. Her köken için 2 besiyeri kullanıldı. Besiyeri yüzeyinin kuruması beklendi. CLSI kriterlerine göre birinci petriye seftazidim (30 µg), seftazidim/klavulonik asit (30/10 µg) (Bioanalyse, Türkiye) ve ikinci petriye sefotaksim (30 µg), sefotaksim/klavulonik asit (30/10 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diskleri penset yardımıyla steril bir şekilde yerleştirildi ve 37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. Klavulonik asit ile kombinasyonlu olan disklerin çevresindeki zon çapının klavulonik asit içermeyen disklerin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla olması ile GSBL pozitifliği doğrulandı (Şekil 3.2, Şekil 3.3).

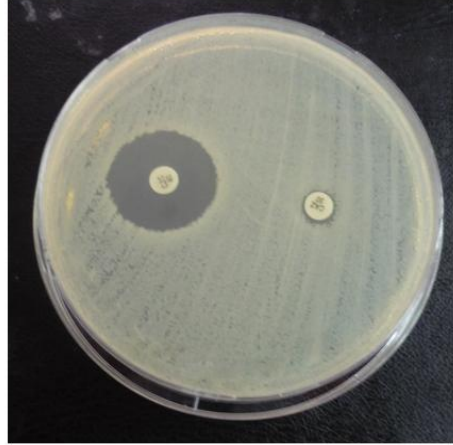


A (GSBL pozitif)



B (GSBL negatif)

Şekil 3.2 Sefotaksim sefotaksim/klavulonik asit disk doğrulama testi



A (GSBL pozitif)



B (GSBL negatif)

Şekil 3.3 Seftazidim ve seftazidim/klavulonik asit disk doğrulama testi

3.6. Kontrol Kökenleri

GSBL tarama ve doğrulama testlerinde *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. coli* ATCC 25922 sırasıyla pozitif ve negatif kontrol kökenleri olarak kullanıldı.

3.7. PZR yöntemi ile CTX-M Genlerinin Varlığının Araştırılması

3.7.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu standart fenol/kloroform yöntemine göre yapıldı (Neumann ve ark. 1992). Bu amaçla EMB besiyerinde saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden (5 koloni) alınarak 1 ml PBS içinde süspanse edildi. Süspansiyon 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı döküldü. Eppendorf tüplerdeki bakteri pelleti üzerine 500 µl Tris EDTA (TE) ve 5 µl lizozim (Sigma, ABD) enzimi eklenerek vortekslendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 12,5 µl proteinaz K (25 mg/ml) (Sigma, ABD), 50 µl %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) eklendi ve 55°C'de 2 saat inkübe edildi. Tüplere 5 M 150 µl NaCl ve 500 µl kloroform eklendi, oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde tüpler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı fazdan 500 µl yeni tüplere alındı. Aktarılan sıvının üzerine 500 µl izopropanol eklendi. Yeni süspansiyon 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve sıvısı döküldü. Dipteki pellet %70'lik alkol ile yıkandı ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki alkol kurutuldu. Tüplere 100 µl di-etil-piro-karbonat (DEPC) eklenerek DNA çözdürüldü ve -20°C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.7.2. CTX-M Genlerinin Amplifiye Edilmesi

CTX-M genlerinin amplifikasyonu Pitout ve ark. (2004)'nın bildirdikleri primerler ve yöntem kullanılarak yapıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan primerler

Hedef*	Primer	5'→3' Oligonükleotid Dizisi	Ürün (bp)	Nükleotid (bp)
CTX-M grup I	CTXM1-F3 CTXM1-R2	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CG C CGA CGC TAA TAC A	499	416-435 914-896
CTX-M grup II	TOHO1-2F TOHO1-1R	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	351	313-334 663-643
CTX-M grup III	CTXM825R CTXM825F	CGC TTT GCC ATG TGC AGC ACC GCT CAG TAC GAT CGA GCC	307	475-495 781-764
CTX-M grup IV	CTXM914F CTXM914R	GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	474	1857-1876 2330-2311

*Grup I; CTX-M-1, -3, -10, -12, -15, -22, -23, -28, -29, ve -30. Grup II; CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, ve -20 ve TOHO-1. Grup III; CTX-M-8. Grup IV; CTX-M-9, -13, -14, -16, -17,-19, -21, -24, -27 ve TOHO-2.

PZR karışımı 25 µl total hacimde 5 µl Taq buffer (10X), 4 µl MgCl₂ (25 mM) (Fermantas, ABD), 0.5 µl dNTP (10mM) (Fermantas, ABD), herbir primerden 1 µl (25 pmol), 0.2 µl Taq polimeraz (5U/ µl) (Fermantas, ABD) ve 2 µl kalıp DNA olacak şekilde hazırlandı. Ön denaturasyon (94 °C'de 5 dk) aşamasını takiben toplam 30 siklus olacak şekilde 94 °C'de 30sn denaturasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 30 sn uzama olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72 °C'de 10 dk son uzama işlemi yapıldı.

3.7.3. Amplifiye Edilen Gen Ürününün Gösterilmesi

Amplifiye edilen PZR ürünleri negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) ile birlikte, DNA marker (100-3000 bp) (Fermantas, ABD) yükleme boyası (6X) (Fermantas, ABD) ile 1/5 oranında karıştırılarak 1X Tris Borate EDTA (TBE) (Wisent, Kanada) tamponu içindeki %2'lik agaroz jele yüklendi. 150 V'da 30 dakikalık elektroforez işleminden sonra görüntüleme ünitesinde (Wealtec Dolphin-View, ABD) incelendi ve 499 bp, 474 bp, 351 bp, 307 bp'lik gen ürünlerinin varlığı yönünden değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel analiz

Veriler SPSS 13.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin sunumunda frekans ve yüzde dağılımları kullanıldı. Testlerin birbiriyle karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kökenlerin izole edildiği örneklerin gönderildiği klinikler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Kökenlerin izole edildiği örneklerin gönderildiği klinikler

Klinik	n (%)
Genel Cerrahi	20 (13.3)
Üroloji	20 (13.3)
Enfeksiyon Hastalıkları	19 (12.6)
Çocuk Hastalıkları	15 (10)
Yoğun Bakım Ünitesi	14 (9.3)
Dahiliye	13 (8.7)
Ortopedi ve Travmatoloji	13 (8.7)
Kadın Hastalıkları ve Doğum	11 (7.3)
Dermatoloji	7 (4.7)
Beyin Cerrahisi	6 (4)
Fizik Tedavi ve Rehabiliyasyon	5 (3.3)
Nöroloji	4 (2.7)
Çocuk Cerrahisi	1 (0.7)
Göz Hastalıkları	1 (0.7)
Plastik Cerrahi	1 (0.7)
TOPLAM	150 (100)

Çalışılan tüm kökenlerin (%100) tigesikline duyarlı oldukları saptandı. İmipenem ve meropenem %99.3’ü, ertapenem %98’i duyarlı olarak bulunurken en fazla dirençli oldukları antibiyotikler sırasıyla ampisilin (%88), sefazolin (%70.7), levofloksasin (%70), sefuroksim aksetil (%70), sefuroksim (%69.3), seftriakson (%68) ve trimetoprim/sulfametaksazol (%66.7) olarak belirlendi.

Kökenlerin otomatize sistem ile belirlenen 17 antibiyotik için MİK değerleri çizelge 4.2’de sunuldu. Bu sonuçlara göre MİK₅₀ değerleri (bakterilerin en az %50’sine etkili olabilmek için gereken MİK değeri) duyarlılık sınırı içinde kalan antibiyotikler piperasilin/tazobaktam, sefuroksim, seftazidim, sefoksitin, sefepim, imipenem, meropenem, ertapenem, amikasin, gentamisin ve tigesiklini. MİK₉₀ değerleri (bakterilerin en az %90’ına etkili olabilmek için gereken MİK değeri) duyarlılık sınırı içinde kalan antibiyotikler imipenem, meropenem, ertapenem, amikasin ve tigesiklini.

Çizelge 4.2 *Escherichia coli* kökenlerine karşı 17 antimikrobiyalın µg/ml cinsinden minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri (n=150)

Antimikrobiyal	Sınır değerler	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
					n (%)	n (%)	n (%)
Ampisilin	≤8 - ≥32	≥32	>32	>32	18 (12)	0 (0)	132 (88)
AMC*	≤8/4 - ≥32/16	4/2-≥32/16	16/8	>32/16	50 (33.3)	45 (30)	55 (36.7)
PTZ**	≤16/4 - ≥128/4	<4/4->128/4	8/4	>128/4	95 (63.3)	15 (10)	40 (26.7)
Sefazolin	≤2 - ≥8	>64	>64	>64	43 (28.7)	1 (0.7)	106 (70.7)
Sefuroksim	≤4 - ≥32	16>64	4	>64	42 (28)	4 (2.7)	104 (69.3)
Seftazidim	≤4 - ≥16	<1->64	4	>64	48 (32)	9 (6)	93 (62)
Sefoksitin	≤8 - ≥32	<4->64	<4	32	114 (76)	13 (8.7)	23 (15.3)
Seftriakson	≤1 - ≥4	<1->64	>64	>64	47 (31.3)	1 (0.7)	102 (68)
Sefepim	≤8 - ≥32	<1->64	2	>64	48 (32)	8 (5.3)	94 (62.7)
İmipenem	≤1 - ≥4	<1	<1	<1	149 (99.3)	0 (0)	1 (0.7)
Meropenem	≤1 - ≥4	<0.25-1	<0.25	<0.25	149 (99.3)	0 (0)	1 (0.7)
Ertapenem	≤0.25 - ≥1	<0.5->8	<0.5	<0.5	147 (98)	1 (0.7)	2 (1.3)
Amikasin	≤16 - ≥64	<2->64	<2	16	95 (63.3)	52 (34.7)	3 (2)
Gentamisin	≤4 - ≥16	<1->64	<1	>16	92 (61.3)	1 (0.7)	57 (38)
Levofloksasin	≤2 - ≥8	<0.12->8	>8	>8	44 (29.3)	1 (0.7)	105 (70)
SXT***	≤2/38 - ≥4/76	1/19-16/304	>4/76	>4/76	50 (50)	0 (0)	100 (66.7)
Tigesiklin	≤0.5- ≥8	<0.5-1	<0.5	<0.5	135 (90)	15 (10)	0 (0)

*AMC: Amoksisilin/Klavulonik Asit

**PTZ: Piperasilin/tazobaktam

***SXT: Trimetoprim/sülfametaksazol

DDTT ile 57 (%38) kökenin GSBL sentezlemediği 93 (%62) kökenin ise GSBL sentezlediği saptandı. Sefotaksim-sefotaksim/klavulonik asit (CTX/CTC) ile yapılan KDDT ile 103 (%68.7) köken pozitif olarak belirlenirken seftazidim-seftazidim/klavulonik asit (CAZ/CZC) ile yapılan KDDT ile 80 (%53.3) köken pozitif olarak belirlendi.

Otomatize sistem ve DDTT karşılaştırıldığında 84 (%56) kökenin her iki testte pozitif olduğu, otomatize sistem ve KDDT'ler karşılaştırıldığında ise benzer şekilde 84 (%56) kökenin CTX/CTC ile KDDT ve otomatize sistemle GSBL testi pozitif olduğu, 70 (%46.7) kökenin CAZ/CZC ile GSBL tarama testi ve otomatize sistemle GSBL pozitif olduğu saptandı. Böylece 41 köken otomatize sistem ve DDTT ile negatif, 84 köken pozitif olarak bulundu. Toplam 125 köken (%83.3) otomatize sistem ve DDTT ile aynı sonucu verirken yine 125 köken (%83.3) otomatize sistem ve CTX/CTC ile KDDT testinde aynı

sonucu verdi. Kökenlerin 110'su (%73.3) otomatize sistem ve CAZ/CZC ile KDDT testinde aynı sonucu verdi (Çizelge.4.3).

Çizelge 4.3 GSBL varlığının saptanmasında fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması

GSBL Testi ve yorumu		GSBL varlığı (Otomatize sistem***)		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
GSBL Disk Difüzyon Tarama Testi	Negatif	41 (27)	16 (10.6)	57	0.000
	Pozitif	9 (6)	84 (56)	93	
GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CTX/CTC*)	Negatif	41 (27)	16 (10.6)	57	0.000
	Pozitif	9 (6)	84 (56)	93	
GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CAZ/CZC**)	Negatif	40 (26.6)	30 (20)	70	0.000
	Pozitif	10 (6.6)	70 (46.6)	80	

*CTX/CTC: Sefotaksim-Sefotaksim/klavulonik asit

**CAZ/CZC: Seftazidim-Seftazidim/klavulonik asit

***Otomatize sistem: Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa)

Hem CAZ/CZC hem de CTX/CTC ile yapılan KDDT ile 79 (%52.7) kökenin GSBL pozitif olduğu, 56 (%37.3) kökenin negatif olduğu böylece 135 (%90) kökenin aynı sonucu verdiği saptandı. KDDT'lerin karşılaştırılması çizelge.4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Kombine disk doğrulama testlerinin karşılaştırması

GSBL Testi ve Yorumu		GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CAZ-CZC**)		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CTX/CTC*)	Negatif	56 (37.3)	1 (0.7)	57	0.000
	Pozitif	14 (9.3)	79 (52.7)	93	
TOPLAM		70 (46.7)	80 (53.3)	150	

*CTX/CTC: Sefotaksim-Sefotaksim/klavulonik asit

**CAZ/CZC: Seftazidim-Seftazidim/klavulonik asit

DDTT diğer doğrulama testleri ile karşılaştırıldığında 92 (%61.3) kökenin hem DDTT hem de CTX/CTC doğrulama testinde GSBL pozitif iken, 46 (%30.7) kökenin negatif olduğu saptanmış olup 138 (%92) kökenin aynı sonucu verdiği bulunmuştur. Hem DDTT hem de CAZ/CZC doğrulama testinde 77 (%51.3) kökenin GSBL pozitif, 56 (%37.3) kökenin negatif olduğu bulunmuştur. Böylece 133 (%88.7) kökenin her iki testte aynı sonucu verdiği saptanmıştır (Çizelge.4.5).

Çizelge 4.5 Disk difüzyon tarama testi ile kombine disk doğrulama testlerinin karşılaştırması

GSBL Testi ve yorumu		GSBL Disk Difüzyon Tarama Testi		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CTX/CTC*)	Negatif	46 (30.6)	1 (0.6)	47	0.000
	Pozitif	11 (7.3)	92 (61.3)	103	
GSBL Kombine Disk Doğrulama Testi (CAZ/CZC**)	Negatif	56 (37.3)	16 (10.6)	72	0.000
	Pozitif	11 (7.3)	77 (51.3)	88	

*CTX/CTC: Sefotaksim-Sefotaksim/klavulonik asit

**CAZ/CZC: Seftazidim-Seftazidim/klavulonik asit

Antimikrobiyal duyarlılıklar ile GSBL varlığı karşılaştırıldığında; Vitek 2 otomatize sistem, DDTT, CAZ/CZC KDDT ile GSBL pozitif olan kökenlerin ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, piperasilin/tazobaktam, sefozolin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, amikasin, gentamisin, levofloksasin, trimetoprim/sulfametaksazol, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime karşı daha dirençli olduğu ($p<0.05$), sefoksitin, imipenem, meropenem ve ertapeneme karşı dirençli olmasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

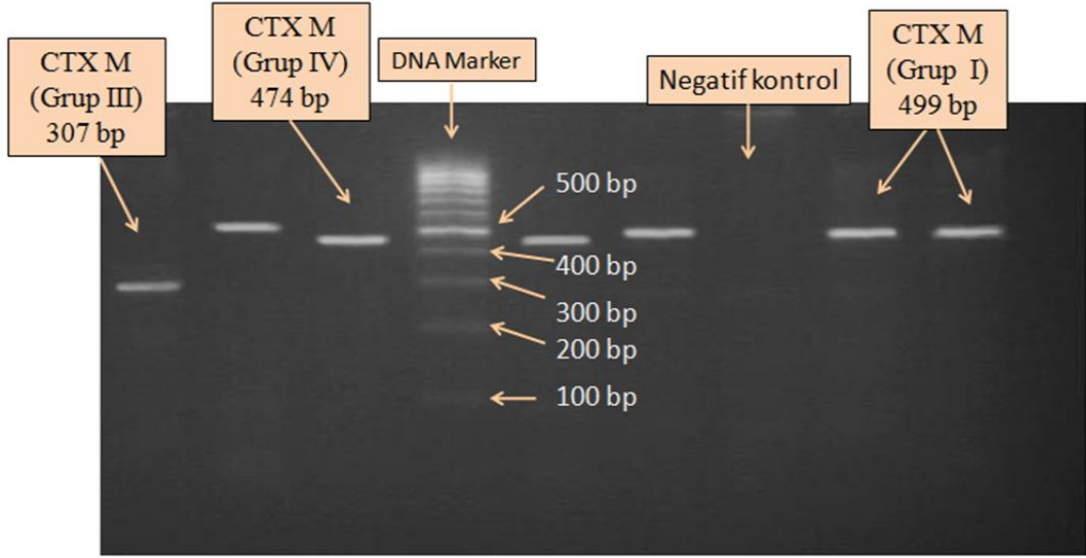
CTX/CTC KDDT ile GSBL pozitif olan kökenlerin ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, sefozolin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, amikasin, gentamisin, levofloksasin, trimetoprim/sulfametaksazol, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime karşı daha dirençli olduğu ($p<0.05$), piperasilin/tazobaktam, sefoksitin, imipenem, meropenem ve ertapeneme karşı dirençli olmasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

PZR yöntemi ile 101 (%67.3) kökende *bla*_{CTX-M} geni tespit edilmiştir. CTX-M taşıyan kökenler içinde 29 (%19.3) kökenin sadece Grup I, bir (%0.7) kökenin sadece Grup II, altı (%4) kökenin sadece Grup III, 14 (%9.3) kökenin sadece Grup IV CTX-M geni taşıdığı belirlenmiştir. Diğer kökenler en az iki gruptan CTX-M içermektedir. Böylece toplamda 69 (%46) kökenin Grup I, 58 (%38.7) kökenin Grup IV, 30 (%20) kökenin Grup II, 11 (%7.3) kökenin ise Grup III *bla*_{CTX-M} geni taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

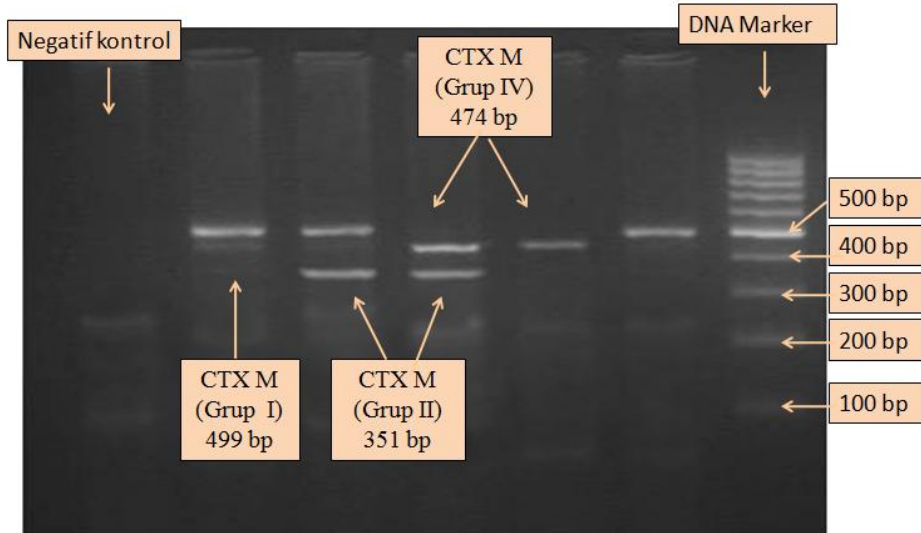
Çizelge 4.6 Kökenlerdeki *bla*_{CTX-M} varlığı ve dağılımı

<i>bla</i> _{CTX-M} varlığı ve grubu		Köken sayısı n (%)
Negatif		49 (32.7)
Pozitif	Grup I	29 (19.3)
	Grup II	1 (0.7)
	Grup III	6 (4)
	Grup IV	14 (9.3)
	Grup I+Grup II	6 (4)
	Grup I+Grup III	1 (0.7)
	Grup I+IV	18 (12)
	Grup II+Grup IV	7 (4.7)
	Grup III+Grup IV	3 (2)
	Grup I+Grup II+Grup IV	15 (10)
	Grup II+Grup III+ Grup IV	1 (0.7)
TOPLAM		150 (100)

Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri (Grup I, III, IV CTX-M)



Şekil 4.2 PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri (Grup I, II, IV CTX-M)

Vitek 2 otomatize sistem, DDTT, CTX/CTC KDDT ile GSBL pozitif olan kökenlerde *bla*_{CTX-M} gen pozitifliği daha fazla bulundu ($p < 0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 PZR yöntemi ile saptanan *bla*_{CTX-M} varlığı ile diğer GSBL tarama ve doğrulama testlerinin karşılaştırılması

Testler ve yorumları		<i>bla</i> _{CTX-M} gen varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
GSBL varlığı (Otomatize sistem*)	Negatif	23 (15.3)	27 (18)	50	0.014
	Pozitif	26 (17.3)	74 (49.3)	100	
GSBL Disk Difüzyon Tarama Testi	Negatif	25 (16.6)	32 (21.3)	57	0.022
	Pozitif	24 (16)	69 (46)	93	
GSBL Doğrulama Testi (CTX-CTC**)	Negatif	25 (16.6)	32 (21.3)	57	0.022
	Pozitif	24 (16)	69 (46)	93	
GSBL Doğrulama Testi (CAZ-CZC***)	Negatif	27 (18)	43 (28.6)	70	0.149
	Pozitif	22 (14.69)	58 (38.69)	80	

*Otomatize sistem: Vitek 2 Compact (Biomérieux, Fransa)

**CTX-CTC: Sefotaksim-Sefotaksim/klavulonik asit

***CAZ-CZC: Seftazidim-Seftazidim/klavulonik asit

PZR yöntemiyle saptanan *bla*_{CTX-M} grupları ile tek tek kökenlerin antimikrobiyallere karşı duyarlılıkları karşılaştırıldığında (orta duyarlı olan kökenler dirençli kabul edilmiştir); Grup I *bla*_{CTX-M} geni içeren kökenlerin ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefuroksim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime yüksek oranda direnç gösterdikleri tespit edilmiş olup bu antibiyotiklerin dışındakilerde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Çizelge 4.8). Grup II ve Grup III *bla*_{CTX-M} geni içeren kökenlerde antimikrobiyallere karşı direnç arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 4.8 PZR yöntemi ile saptanan Grup I *bla*_{CTX-M} geni varlığı ile antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

Antibiyotik duyarlılık durumu		Grup I <i>bla</i> _{CTX-M} varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
Ampisilin	Dirençli	65 (43.3)	66 (44)	132	0.01
	Duyarlı	15 (10)	3 (2)	18	
Amoksisilin/klavulonik asit	Dirençli	44 (29.3)	56 (37.3)	100	0.002
	Duyarlı	37 (24.6)	13 (8.6)	50	
Sefuroksim	Dirençli	48 (32)	61 (40.6)	109	0.000
	Duyarlı	33 (22)	8 (5.3)	42	
Seftriakson	Dirençli	42 (28)	61 (40,6)	103	0.000
	Duyarlı	39 (26)	8 (5.3)	47	
Sefepim	Dirençli	41 (27.2)	61 (40.6)	102	0.000
	Duyarlı	40 (26.6)	8 (5.3)	48	
Sefotaksim	Dirençli	31 (20.6)	62 (41.3)	93	0.000
	Duyarlı	50 (33.3)	7 (4.6)	57	
Aztreonam	Dirençli	28 (18.6)	51 (34)	79	0.000
	Duyarlı	53 (35.3)	18 (12)	71	
Sefpodoksim	Dirençli	32 (21.3)	63 (42)	95	0.000
	Duyarlı	49 (32.6)	6 (4)	55	

PZR yöntemi ile saptanan Grup IV *bla_{CTX-M}* varlığı ile kökenlerin yüksek oranda dirençli olduğu antibiyotikler Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 PZR ile saptanan Grup IV *bla_{CTX-M}* geni varlığı ile kökenlerin antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki

Antibiyotik duyarlılık durumu		Grup IV <i>bla_{CTX-M}</i> varlığı		TOPLAM	P
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)		
Ampisilin	Dirençli	86 (57.3)	46 (30.6)	132	0.018
	Duyarlı	6 (4)	12 (8)	18	
Sefuroksim	Dirençli	78 (52)	36 (24)	108	0.0023
	Duyarlı	20 (13.3)	22 (14.6)	42	
Seftriakson	Dirençli	70 (46.6)	33 (22)	103	0.016
	Duyarlı	22 (14.6)	25 (16.6)	47	
Sefotaksim	Dirençli	63 (42)	30 (20)	93	0.040
	Duyarlı	29 (19.3)	28 (18.6)	57	
Sefpodoksim	Dirençli	64 (42.6)	31 (20.6)	95	0.046
	Duyarlı	28 (18.6)	27 (18)	55	

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae üyesi bakteriler toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenleri haline gelmiştir. Beta-laktamlar bu mikroorganizmaların sebep olduğu infeksiyonların tedavisinde başlıca seçenektir. Beta-laktamlara karşı direnç başlıca GSBL sentezi ile gelişmektedir. *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında bu direnç tipi oldukça yaygındır (Gür 2002).

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de GSBL sentezleyen kökenlerin yayıldığı görülmektedir. Yumuk ve ark. (2008) 2004 ile 2005 yıllarında toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarına sebep olan *E. coli*’lerde GSBL sentezleme oranını %21 olarak bulmuşlardır. Kaygusuz ve ark. (2011) 2005 yılında *E. coli* kökenlerinde GSBL pozitifliğini %30, 2006 yılında ise %29 olarak belirlemişlerdir. Akçay ve ark. (2010) 15434 *E. coli* kökeninde GSBL oranını %10.9 olarak bulmuşlar ve beş yıllık sürede GSBL pozitif *E.coli* oranlarının her yıl önceki yıla göre anlamlı derecede arttığını saptamışlardır. Duman ve ark. (2010) ayaktan tedavi gören hastalardan izole edilen *E. coli* kökenlerinin 104’ünde (%13.9), yatan hastalardan izole edilen kökenlerin ise 471’inde (%27.5) GSBL pozitifliği saptamışlardır. Eryılmaz ve ark. (2010) çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. coli* kökenlerinde GSBL sıklığını %18.42 olarak bulmuşlardır.

Uluslararası çok merkezli süveyans çalışmalardan biri olan MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) verilerine göre 2000-2003 yılları arasında dokuz merkezde izole edilen *E. coli* kökenlerinde GSBL oranı %19.5 olarak verilmiştir (Korten ve ark. 2005). MYSTIC çalışmasının 1997-2004 yılları arasında çalışmaya katılan tüm merkezlerde Gram negatif basillerde GSBL %28 olarak saptanmıştır (Jones ve ark. 2005). Bir diğer çok merkezli SENTRY Antimikrobiyal Süveyans Programı verilerine göre 1998 ile 2002 yılları arasında Asya-Pasifik bölgede *E. coli* kökenlerinde Çin’de %24.5, Hong Kong’da %14.3, Singapur’da %11.3 oranında GSBL üretimi bildirilmiştir (Hirakata ve ark. 2005). Global süveyans çalışmalarından TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) ve SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) çalışmalarında Avrupa’daki GSBL oranının Latin Amerika ve Asya/Pasifik bölgesinden daha az ancak Kuzey Amerika’da daha fazla olduğu bildirilmiştir (Coque ve ark. 2008). İspanya’da 2000 yılında ilk kez GSBL üreten *E. coli* süveyans çalışması

yapılmıştır (Hernández ve ark. 2005) ve GSBL üreten *E. coli* oranı %0.5 olarak bulunmuştur. Aynı ulusal çalışma altı yıl sonra yapıldığında oranın %4.04'e yükseldiği saptanmıştır (Angel ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda belirli bir süredeki GSBL oranları belirlenmemiş, otomatize sistem ile GSBL saptanan 100 ve GSBL bulunmayan 50 *E. coli* kökeni çalışmaya alınarak GSBL saptama yöntemleri birbiriyle karşılaştırılmıştır.

GSBL üreten bakterilerin saptama yöntemleri ilk kez Jarlier ve ark. (1988)'nin tarif ettiği çift disk testi ile başlamaktadır. Bu yöntem yıllarca referans test olarak kullanılmıştır (Katsanis ve ark. 1994, Sanders ve ark. 1996, Thomson ve Sanders 1992). Vitek GSBL kartları (Sanders ve ark. 1996) E test stripleri (Cormican ve ark. 1996), ve daha yeni olarak MicroScan panellerde (Moland ve ark. 1998) GSBL üreten kökenleri saptamak için kullanılmaktadır ve hepsinin %90 duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (Tenover ve ark. 1999). GSBL testi içeren Vitek kartları FDA onaylıdır. Vitek GSBL testi sefotaksim ve seftazidim (0.5 µg/ml) ve bu antibiyotiklerin klavulonik asit (4 µg/ml) ile kombinasyonlarını kullanarak GSBL pozitifliğini saptar (Paterson ve Bonomo 2005). Testin duyarlılık ve özgüllüğü %90'dır (Sanders ve ark. 1996).

Tenover ve ark. (2003) 131 *E. coli* kökeninin broth mikrodilüsyon metodu ile 21'inde, bu 21 kökenin ise 18'inde sefotaksim veya seftazidim diski doğrulama testinde GSBL pozitifliği saptamışlardır. İzoelektrik odaklama yöntemi ile TEM ve AmpC beta-laktamaz varlığını araştırdıkları aynı çalışmada uyguladıkları tüm yöntemler değerlendirildiğinde 131 kökenin sadece %16'sının GSBL sentezlediğini saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda Vitek 2 otomatize sistem, DDTT ve KDDT'lerinin sonuçları uyumlu çıkmakla birlikte Vitek 2 otomatize sistem ile en uyumlu bulunan yöntem DDTT ve CTX/CTC KDDT olduğu bulundu. Vitek 2 otomatize sistem ile her iki testte 125 (%83.3) köken, Vitek 2 otomatize sistem ve CAZ/CZC KDDT'te 110 (%73.3) köken aynı sonucu verdi.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada 107 kökende (*E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K. oxytoca*) çift disk doğrulama testi ve E test yöntemleri ile GSBL varlığı araştırılmıştır (D'Azevedo ve ark. 2004). Kökenlerin %67'sinde çift disk doğrulama testi ile %54'ünde E test ile GSBL pozitifliği saptanırken %17'sinde ise GSBL pozitifliği saptanmamıştır. Çift disk doğrulama testi ile GSBL üretiminin doğrulamasının substrata göre değiştiği (CTX veya CAZ), tarama yöntemlerinin performansının çift disk doğrulama testi ile karşılaştırıldığında değişken olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda CAZ/CZC KDDT

ve CTX/CTC KDDT ile alınan sonuçlar birbiriyle uyumludur ($p < 0.05$). CAZ/CZC KDDT ve CTX/CTC KDDT ile 135 (%90) köken aynı sonucu verdi. M'Zali ve ark. (2000) yaptığı çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak seftazidim diskinin GSBL pozitif izolatları saptamada daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada altın standart olarak E testi belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda PZR yöntemi altın standart olarak alınabilecek gibi görünmekle birlikte PZR yöntemiyle sadece *bla_{CTX-M}* geninin varlığını araştırdığımız ve bu genin olmaması diğer GSBL genlerinin olmayacağı anlamına gelmediği için testlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri hesaplanamamıştır. Daha önce GSBL varlığı doğrulanmış 20 köken ve 49 klinik kökene dört fenotipik doğrulama testi (MicroScan GSBL panelleri, Vitek GNS-120 ve Sensi-Disk GSBL doğrulama test diskleri ve Etest.) uygulananan bir çalışmada (Linscott ve ark. 2005) Vitek GNS-120'nin özgüllüğü %98, duyarlılığı %99 olarak bulunmuştur.

Espinar ve ark. (2011) Vitek 2 otomatize sistem (BioMérieux) ile Phoenix otomatize Sistem (BD Diagnostic Systems) ve MicroScan WalkAway-96 Sistem (Dade Behring) ve iki manual yöntemi, E test (AB Biodisk) ve çift disk difüzyon testini karşılaştırdıkları çalışmada Vitek 2 otomatize sistem ile GSBL pozitif saptanan 110 *E. coli* ve 72 *K. pneumoniae* kökenini diğer yöntemlerle de çalışmışlardır. Dört yöntemin sonuçları 182 kökenden 126 tanesinde uyumlu olarak bildirilmiş ve çalışmada Vitek 2 otomatize sistem ile %23.9 kökende çift disk difüzyon ile farklı sonuç bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bu çalışma ile benzer olarak Vitek 2 otomatize sistem ile negatif bulunan dokuz (%18) kökende DDTT ve CTX/CTC KDDT ile pozitif bulunurken 10 (%20) kökende CAZ/CZC KDDT ile pozitif bulunmuştur. Vitek 2 otomatize sistem ile pozitif bulunan 16 (%16) köken DDTT ve CTX/CTC KDDT ile negatif bulunmuştur. Bizim çalışmamızı destekleyen başka bir çalışmada (dokuz yöntem karşılaştırılmış ve Vitek 2 otomatize sistem, disk difüzyon, E test, disk kombinasyon testi, çift disk sinerji, cloxacillin içeren MHA ve Cica-Beta testleri) 107 *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriye uygulanmış, %49'u GSBL pozitif olarak bulunmuştur. Vitek 2 otomatize sistemin duyarlılığı %73-79, disk difüzyonun duyarlılığı %96, E testin özgüllüğü %62, çift disk difüzyonun özgüllüğü %100 bulunmuştur. Yukardaki çalışmaların ışığı altında Vitek 2 otomatize sistem ile saptanan GSBL pozitifliğinin diğer KDDT ile doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz. Garrec ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada disk difüzyon testinin duyarlılığın %96 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda DDTT ve KDDT'lerin sonuçları karşılaştırıldığında

Vitek 2 otomatize sisteme göre daha uyumlu bulunmuştur. DDTT ve CTX/CTC KDDT ile 138 (%92) köken, DDTT ve CAZ/CZC KDDT ile de 133 (%88.7) kökende aynı sonuç alınmıştır.

İlk kez 1986 yılında Matsumoto ve ark. (1988) tarafından saptanan CTX-M tip beta-laktamazların 1995 yılından itibaren tüm dünyada hızla yayıldığı gözlenmiştir (Bonnet 2004). Günümüzde CTX-M tip beta-laktamazların Latin Amerika, Uzak Doğu, Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Afrika'yı da kapsayan geniş bir coğrafik alana yayılmış olduğu görülmektedir.

Türkiye'de ilk CTX-M (CTX-M-3) tip beta-laktamaz Açıkgöz ve ark. (2003) tarafından sefotaksim ve aztreonam dirençli *Shigella sonnei* izolatından izole edilmiştir. Yine aynı yıl Lartigue ve ark. (2003) tarafından *K. pneumoniae* kökeninde CTX-M-15 saptanmıştır. Bahar ve ark. (2006) sefotaksim, aztreonam, sefepime dirençli *S. enterica* serovar Virchow kökeninde CTX-M-3 enzimini saptamışlardır.

Ülkemizde altı farklı merkezin dahil olduğu HİTİT çalışmasında Gür ve ark. (2008) 1196 Gram negatif hastane kökeninde GSBL üretimi E test yöntemiyle araştırılmış ve 457 *E.coli* kökeninin %26'sının GSBL ürettiği saptanmıştır. En sık tespit edilen (%71.4) enzim CTX-M olmuştur. Bu enzimler içinde CTX-M-15 (%69.4), CTX-M-3 (%28.6), CTX-M-1 (%2) en sık rastlanan tipler olarak belirlenmiştir. 2007 yılında ülkemizde yapılan HİTİT 2 Sürveyans çalışmasında Gür ve ark. (2009) 438 *E. coli* kökeninden %42'sinin GSBL ürettiği saptanmıştır. CTX-M sıklığı %96.2 olarak bulunmuş olup *E. coli* kökenlerinde en sık görülen enzim tipi CTX-M olarak saptanmıştır. İki çalışma incelendiğinde GSBL varlığının ve CTX-M oranının arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda CTX-M oranı %67.3 olarak bulunmuş olup bu ulusal çalışmadaki oranlardan azdır. Bunun sebebi çalışmanın yapıldığı tarihler arasında izole edilen tüm *E. coli* kökenlerinin değil Vitek 2 otomatize sistem ile saptanmış GSBL pozitif 100 köken ve GSBL negatif 50 kökenin çalışmaya dahil edilmesi olabilir.

Ülkemizde CTX-M tipi enzimlerin prevalansı ve dağılımı ile ilgili veriler sınırlı olmakla birlikte son yıllarda artmıştır. Doğan Çelik ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyon etkeni 30 *E.coli* kökeninin 11'inin GSBL ürettiğini bunların %36.7'sinin *bla*_{CTX-M} geni taşıdığını bu 11 kökeninde yedisinin *bla*_{CTX-M-15}, üçünün *bla*_{CTX-M-3} ve birinin *bla*_{CTX-M-1} yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır. Gönüllü ve ark.(2008) GSBL ureten *E.coli* suşlarının %86.8'inde CTX-M-1 grubu

enzimlerin üretildiğini ve CTX-M-15 insidansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yumuk ve ark. (2008) 2004 ile 2005 yıllarında toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarına sebep olan *E. coli*'lerde yaptıkları çalışmada kökenlerin %76.5'inin *bla*_{CTX-M} içerdiğini ve Türkiye'den bildirilen diğer çalışmalarda olduğu gibi birinci gruptaki CTX-M-15 tipinin en sık saptandığını bildirmişlerdir. Bayraktar ve ark. (2010) çalıştıkları 200 adet GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi bakterinin 167'sinin (%83.5) *bla*_{CTX-M} geni içerdiğini, bu bakteriler içinde de 141 *E.coli* kökeninin 132'sinin (%93.6) *bla*_{CTX-M} taşıdığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da ülkemizdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak en fazla Grup I *bla*_{CTX-M} geni, ikinci sıklıkta ise Grup IV *bla*_{CTX-M} geni saptanmıştır.

GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler kural olarak bütün sefalosporinlere ve geniş spektrumlu penisilinlere (monobaktam, aztreonam) dirençlidir. (Köksal 2003)

Bizim çalışmamızda kökenlerin en duyarlı oldukları antibiyotiğin karbapenemler olduğu görüldü. Vitek 2 otomatize sistem, DDTT, CAZ/CZC KDDT ve CTX/CTC KDDT ile GSBL saptanan kökenlerin ampisilin, amoksisilin/klavulonik asit, piperasilin/tazobaktam, sefozolin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, amikasin, gentamisin, levofloksasin, trimetoprim/sulfametaksazol, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime karşı daha dirençli oldukları, GSBL varlığının sefoksitin, imipenem, meropenem ve ertapeneme karşı direnç durumunu değiştirmedeği saptanmıştır.

GSBL üreten bakterilerin sebep olduğu infeksiyonlarda antibiyotik seçenekleri sınırlıdır (Paterson ve Bonomo 2005). Bu bakteriler sefalosporinlere *in vitro* duyarlı görünse bile bu antibiyotiklerle tedavileri imkansızdır (Paterson ve ark. 2001).

GSBL üreten kökenler florokinolonlar ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotiklere de yüksek direnç gösterme eğilimindedir (Paterson ve ark. 2004, Lautenbach ve ark. 2001, Paterson ve ark. 2000). Florokinolonlar eğer bakteri *in vitro* duyarlı ise orta şiddetli infeksiyonların tedavisinde faydalı olabilir. Florokinolonlar GSBL üreten bakterilerin tedavisinde karbapenemler kadar etkilidir (Endimiani ve ark. 2004, Kang ve ark. 2004). Ancak bizim çalışmamızda da GSBL üreten bakterilerin beta-laktam antibiyotiklerle birlikte florokinolon ve aminoglikozidlere de daha dirençli oldukları saptanmıştır.

Karbapenemler GSBL üreten bakterilerin sebep olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde seçilecek antibiyotiklerdir (Harada ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda da dört yöntemle GSBL ürettiği belirlenen bakterilerde GSBL varlığının karbapenem direnç durumunu etkilemediği tespit edilmiştir.

Sefamisinler (sefoksitin, sefotetan) GSBL'nin hidrolitik aktivitesine karşı stabildir (Harada ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda da sefoksitin direnç durumu GSBL varlığından etkilenmemektedir. Bununla birlikte GSBL üreten organizmaların tedavisi sırasında dış membran proteininin ekspresyonundaki azalma sefamisinlere karşı dirence neden olabilir (Jeong ve ark. 2008). AmpC tip beta-laktamazların üretimi de sefamisinlere direnç gelişimine sebep olur. Bunun için sefamisinler GSBL üreten bakterilerin tedavisinde birinci seçenek değildir.

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları (amoksisilin/klavulonik asit, piperasilin/tazobaktam vb.) sıklıkla GSBL üreten bakterilere karşı aktif olarak kalır, fakat diğer direnç mekanizmaları bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine sebep olabilir. Bizim çalışmamızda GSBL varlığı amoksisilin/klavulonik asit, piperasilin/tazobaktam direncini istatistiksel olarak etkiliyor gibi görünmekle birlikte diğer direnç mekanizmalarının bu dirençten sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

CTX-M enzimi genellikle aminopenisilin (ampisilin ya da amoksisilin), karboksipenisilin (karbenisilin ya da tikarsilin), üreidopenisilin (piperasilin) ve dar spektrumlu sefalosporinlere (sefalotin, sefaloridin, sefuroksim) karşı yüksek düzey direnç sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda da Grup I *bla*_{CTX-M} saptanan kökenlerin daha fazla ampisilin, amoksisilin klavulonik asit, sefuroksim, seftriakson, sefepim, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime dirençli oldukları saptanmıştır.

Bonett'in (2004) belirttiği gibi bizim çalışmamızda da sefoksitin ve karbapenem duyarlılıkları CTX-M varlığı ile değişmemiştir.

CTX-M enzimlerinin birçoğu sefotaksim ve seftriakson gibi oksimino sefalosporinlere yüksek düzey, sefepim ve sefpiroma farklı düzeyde direnç sağlar. Aztreonam MİK seviyeleri de yüksektir. Bizim çalışmamızda benzer olarak Grup I ve Grup IV *bla*_{CTX-M} varlığı ile sefotaksim ve seftriakson direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (p<0.05). Grup I *bla*_{CTX-M} varlığı ile aztreonam direncinin arttığı saptanmıştır.

Beta-laktam-inhibitör kombinasyonuna karşı direnç düzeyi üretilen enzimin miktarına bağlıdır. Amoksisilin/klavulonik asit ve tikarsilin/klavulonik asit kombinasyonlarının MİK'leri değişkendir ve birçoğunda duyarlılık ya da düşük düzey direnç gözlenir. Bizim çalışmamızda amoksisilin/klavulonik asit direnci ile Grup I *bla*_{CTX-M} varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$).

6. SONUÇ

Bu çalışmada GSBL ürettiği Vitek 2 otomatize sistemle saptanmış olan 100 *E. coli* ve GSBL negatif 50 *E. coli* kökeni çalışmaya dahil edildi. Vitek 2 ile antimikrobiyal duyarlılıkları ve GSBL varlığı bakılan kökenlere disk difüzyon tarama testi, kombine disk doğrulama testleri uygulandı, PZR yöntemiyle *bla*_{CTX-M} genlerinin varlığı araştırıldı.

Vitek 2 ve DDTT ve KDDT'lerinin sonuçları uyumlu çıkmakla birlikte Vitek 2 ile en uyumlu bulunan yöntem DDTT ve sefotaksim-sefotaksim/klavulanik asit (CTX/CTC) KDDT idi. Vitek 2 ile her iki testte 125 (%83.3) köken pozitif veya negatif aynı sonucu verirken Vitek 2 ve seftazidim-seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CZC) KDDT'de 110 (%73.3) köken aynı sonucu verdi. CAZ/CZC KDDT ve CTX/CTC KDDT ile 135 (%90) köken aynı sonucu verdi. DDTT ve KDDT'lerin sonuçları karşılaştırıldığında Vitek 2 otomatize sisteme göre daha uyumlu bulunmuş olup sırasıyla DDTT ile CTX/CTC ve DDTT ile CAZ/CZC KDDT'de 138 (%92) ve 133 (%88.7) kökende aynı sonuç alındı.

Vitek 2 otomatize sistem ile diğer testler arasında anlamlı bir uyum saptamamıza rağmen DDTT ve KDDT'ler ile daha uyumlu sonuçlar alındı. Vitek 2 ile saptanan GSBL'lerin diğer KDDT ile doğrulanması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

Vitek 2 otomatize sistem, DDTT, CAZ/CZC KDDT ve CTX/CTC KDDT ile GSBL saptanan kökenlerin ampisilin, sefozolin, sefuroksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, trimetoprim/sulfametaksazol, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksime karşı daha dirençli oldukları, GSBL varlığı sefoksitin, imipenem, meropenem ve ertapeneme karşı duyarlılığı etkilemediği saptanmıştır. GSBL varlığı amoksisilin/klavulonik asit, piperasilin/tazobaktam direncini istatistiksel olarak etkiliyor gibi görünmekle birlikte diğer direnç mekanizmalarının bu dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca GSBL üreten bakterilerin beta-laktam antibiyotiklerle birlikte florokinolon ve aminoglikozidlere daha dirençli oldukları saptanmıştır. Çalışmamızda dört yöntemle GSBL ürettiği belirlenen kökenlerde GSBL varlığının karbapenem direncine yol açmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle karbapenemler GSBL üreten bakterilerin sebep olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde seçilecek antibiyotiklerdir.

PZR ile kökenlerin %32.7'sinin *bla*_{CTX-M} geni yönünden negatif, %67.3'ünün ise pozitif olduğu saptanmıştır. Kökenlerin sıklık sırasına göre Grup I (%46), Grup IV (%38.6), Grup II (%20) ve Grup III (%7.3) *bla*_{CTX-M} geni taşıdığı tespit edildi.

Ülkemizde yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızda *E.coli* kökenlerinin yüksek oranda CTX-M tipi beta-laktamaz sentezlediği ve bunlar arasında en sık Grup I *bla*_{CTX-M} geni saptanmıştır. Bu da *bla*_{CTX-M} geninin ülkemizde hızlı bir şekilde yayıldığını göstermektedir. Bu sebeple ülkemizde CTX-M beta-laktamaz üretiminin sürveyansı önemlidir. *bla*_{CTX-M} geninin tipini belirleyebilmek için insidansı fazla olan gruptaki *bla*_{CTX-M} genlerin çalışılması takip açısından uygun olacaktır.

Otomatize sistem ile GSBL negatif bulunan 27 kökende, disk difüzyon tarama testi ve CTX-CTC disk doğrulama testi ile GSBL negatif bulunan 32 kökende ve CAZ-CZC disk doğrulama testi ile GSBL negatif bulunan 43 kökende *bla*_{CTX-M} geni saptanmıştır. Bir genin varlığı onun eksprese olacağı anlamına gelmediği için GSBL üretimine sebep olmayabilir. Veya sadece *bla*_{CTX-M} genini içermesi diğer GSBL genlerini içermeyeceği anlamına gelmediği için fenotipik yöntemlerle CTX-M beta-laktamaz varlığı atlanabilmektedir. Bir hastada kolonize olan ya da enfeksiyona yol açan *bla*_{CTX-M} genini içeren bir bakteri hastane çalışanlarının elleri ve kullanılan aletler ile hastalar arasında yayılabilmektedir. Bu nedenle CTX-M beta-laktamaz üretimi olmasa bile bu geni içeren bakterilerin takibi önemlidir. Bu tür antimikrobiyal dirence sebep olan genleri içeren bakterilerin varlığı saptanmış olan hastalar izole edilmeli, kullanılan aletler dezenfekte edilmeli, hastane çalışanlarının ellerini yıkaması sağlanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Acikgoz ZC, Gulay Z, Bicmen M, Göcer S, Gamberzade S.** CTX-M-3 extended spectrum beta-lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey, *Scand J Infect Dis*, **2003**, s. 35(8): 503-505.
2. **Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, Sarıgüzel Sar N, Gültekin M ve ark.** Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. *ANKEM Derg*, **2010**, 24(1):34-41.
3. **Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **1980**, s. 289(1036): 321-331.
4. **Angel DM, Ramón HJ, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006); Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **2009**, s. 27(9): 503-510.
5. **Bahar G, Mert A, Catania MR, Koncan R, Benvenuti C, Mazzariol A.** Strain of *Salmonella enterica* serovar Virchow Isolated in Turkey and Carrying a CTX-M-3 Extended-Spectrum Beta-Lactamase. *J Chemother*, **2006**, s. 18(3): 307-310.
6. **Barthelemy M, Pe'duzzi J, Bernard H, Tancre`de C, Labia R.** Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta*, **1992**, s. 1122(1): 15–22.
7. **Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, **1990**, s. 18(5): 294–298.
8. **Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R ve ark.** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*, **1992**, s. 20(3): 158–163.
9. **Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S. ve ark.** Characterization of Beta-lactamase gene *bla_{PER-2}*, which encodes an extended-spectrum class A Beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**, s. 40(3): 616–620.
10. **Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E.** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten gram negatif bakterilerde *bla_{CTX-M}* beta-laktamaz genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* **2010**; 44: 187-196.
11. **Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R.** A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother*, **1992**, s. 29(5): 590-592.
12. **Bonnet R, Sampaio J L M, Labia R, Champs C D, Sirot D ve ark.** A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaximeresistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**, s. 44(7): 1936–1942.
13. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, s. 48(1): 1-14.
14. **Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M ve ark.** Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, **1987**, s. 2: 302–306.

15. **Bradford PA.** Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microb Rev*, **2001**, s. 14(4): 933-951.
16. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**, s. 39(6): 1211–1233.
17. **Canton R, Coque TM.** The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, **2006**, s. 9(5): 466-475.
18. **Cao V, Lambert T, Courvalin P.** ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTXM- 17. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, s. 46(5): 1212–1217.
19. **Casals JB, Pringler N.** Detection in the routine laboratory of new plasmid mediated broad-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae. In Proceedings of the 7th Mediterranean Congress of Chemotherapy, Barcelona, Spain. 20-25 mayıs 1990.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA. **2011**, CLSI.
21. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, **2008**, s. 13(47): 1-11.
22. **Cormican MG, Marshall SA, Jones RN.** Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol*, **1996**, s. 34(8): 1880–1884.
23. **Çolak D.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, **1999**, s:81-89.
24. **Danel F, Hall L M C, Duke B, Gur D, Livermore DM.** OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1999**, s. 43(6): 1362–1366.
25. **Datta N, Kontomichalou P.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, **1965**, s. 208(5007): 239-241.
26. **D’Azevedo PA, Gonçalves ALS, Musskopf MI, Ramos CG, Dias CAG.** Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Braz J Infect Dis*, **2004**, s. 8(5): 372-377.
27. **Decousser JW, Poirel L, Nordmann P.** Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, s. 45(12): 3595–3598.
28. **Dogan Celik A, Yulugkural Z, Kuloglu F, Eroglu C, Torol S ve ark.** CTX-M Type Extended Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates From Community Acquired Upper Urinary Tract Infections at a University in the European Part of Turkey. *J Microbiol Immunol Infect* **2010**;43(2):163–167.
29. **Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A, Tekerekoğlu MS.** *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. *Fırat Tıp Dergisi*, **2010**, 15(4): 197-200.
30. **Emery CL, Weymouth LA.** Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol*, **1997**, s. 35(8): 2061-2067.

31. **Endimiani A, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A. ve ark.** Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum β -lactamase: treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin. *Clin Infect Dis*, **2004**, s. 38(2): 243-251.
32. **Eryılmaz M, Bozkurt ME, Yıldız MM, Akın A.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığının araştırılması. *Marmara Eczacılık Dergisi*, **2010**, s. 14: 10-12.
33. **Espinar MJ, R Rocha , M Ribeiro , Gonçaves RA, Pina-Vaz C.** Extended-spectrum {beta}-lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *J Med Microbiol*, **2011**, s. 60(6): 756-760.
34. **Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J.** Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, **2011**, 49(3):1048-57.
35. **Gülay Z.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, **1999**, s. 91-108.
36. **Gür D.** Beta-laktamazlar. *Flora*, **1997**, s. 2(1): 3-15.
37. **Gür D.** İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, **2002**, s. 182-192.
38. **Gür D.** Genişlemiş Spektrumlu (ESBL) ve Plazmid Kaynaklı AmpC β -Laktamazlar. *Klimik derg*, **2005**, s. 18 (Özel Sayı 1) : 147-151.
39. **Gür D, Gülay Z, Akan OA, Aktaş Z, Kayacan CB ve ark.** Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul*, **2008**, s. 42(4): 537-544.
40. **Gür D, Hascelik G, Aydın N, Telli M, Gultekin M ve ark.** Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Hospital Isolates: Results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother*, **2009**, s. 21(4): 383-389.
41. **Gniadkowski, M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B ve ark.** Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime- hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**, s. 42(4): 827-832.
42. **Gonullu N, Aktaş Z, Bal Kayacan C, Salioglu M, Carattoli A ve ark.** Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 1110-1112.
43. **Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K.** Extended-spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*, **2008**, s. 28(6): 401-412.
44. **Hawkey PM, Jones AM.** The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*, **2009**, s. 64(1): 3-10.
45. **Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A.** Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**, s. 49(5): 2122-2125.
46. **Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S ve ark.** SENTRY Asia-Pacific Participants. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**, s. 52(4): 323-329.

47. **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 beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, **1998**, s. 42(1): 49–54.
48. **Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG.** CDC Definitions of nosocomial surgical site infections, *Infect Control Hosp Epidemiol*, **1992**, s. 13(10): 606-608.
49. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R ve ark.** Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, s. 46(9): 3045–3049.
50. **Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M ve ark.** Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1995**, s. 39(10): 2269–2275.
51. **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**, s. 10(4): 867–878.
52. **Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS ve ark.** Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**, s. 31(5): 467-471.
53. **Jones RN, Mendes C, Turner PJ, Masterton R.** An overview of the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program: 1997-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**, s. 53(4): 247-256.
54. **Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB ve ark.** Bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, s. 48(12): 4574-4581.
55. **Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P.** Plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett*, **2001**, s. 201(2): 237–241.
56. **Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA.** Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, s. 45(7): 2141–2143.
57. **Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA.** Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol*, **1994**, s. 32(3): 691–696.
58. **Kaygusuz R, Çelik C, Çabuk A, Bakıcı MZ.** Bir üniversite hastanesi hastalarından izole edilen gram negatif basillerde geniş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin retrospektif olarak araştırılması. *Cumhuriyet Tıp Derg*, **2011**, s. 33: 2-9.
59. **Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **1983**, s. 11(6): 315–317.
60. **Kong KF, Schneper L, Mathee K.** Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS*, **2010**, s. 118(1): 1–36.
61. **Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B.** Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Turkish MYSTIC Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**, s.59(4): 453-457.

62. **Köksal İ.** Klinik Mikrobiyoloji. Antibakteriyel İlaçlar. 9. Baskı, Atlas Kitabevi, Ankara, **2009**, s. 1077-1113.
63. **Kuyucu N.** Antibiyotik Direnci. *Çocuk Enfeksiyonları Dergisi*, **2007**, s.1: 33-38.
64. **Lartigue MF, Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P.** First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother*, **2003**, s. 52(2): 315-316.
65. **Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH ve ark.** Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, **2001**, s. 33(8): 1288-94.
66. **Linscott AJ, Brown WJ.** Evaluation of Four Commercially Available Extended-Spectrum Beta-Lactamase Phenotypic Confirmation Tests. *J Clin Microbiol*, **2005**, s. 43(3): 1081-1085.
67. **Livermore DM, Williams JD.** Antibiotics in Laboratory Medicine. β -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance, fourth edition, Baltimore: Williams & Wilkins, **1996**, s. 502-578.
68. **M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM.** Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother*, **2000**, s. 45(6): 881-885.
69. **Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, **1988**, s. 32(8): 1243-1246.
70. **Moland ES, Sanders CC, Thomson KS.** Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of β -lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? *J Clin Microbiol*, **1998**, s. 36(9): 2575-2579.
71. **Naas, T, Poirel L, Karim A, Nordmann P.** Molecular characterization of In50, a class1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, **1999**, s. 176(2): 411-419.
72. **Neumann B, Pospiech A, Schairrer HU.** Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends Genet*, **1992**, s. 8: 332-333.
73. **Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y ve ark.** Characterization of a novel extended-spectrum Beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1993**, s. 37(5): 962-969.
74. **Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Juniorperiod JE ve ark.** Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, s.46(12): 3829-3836.
75. **Ouellette M, Paul GC, Philippon AM, Roy PH.** Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in β -lactamase characterization of 114 resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **1988**, s. 32(3): 397-399.
76. **Öztürk R.** Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Geliştirme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyumu. İstanbul, Türkiye, Kasım 2002, s. 83-100.
77. **Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA.** Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol*, **2001**, s. 39(10): 3747-3749.

78. **Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, Casellas JM, Mulazimoglu L ve ark.** 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**, s. 39(6): 2206-2212.
79. **Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H ve ark.** Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*, **2000**, s. 30(3): 473-478.
80. **Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, Mohapatra S, Casellas JM ve ark.** Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Implications of production of extended-spectrum β lactamases. *Clin Infect Dis*, **2004**, s. 39(1): 7-31.
81. **Paterson DL, Bonomo LA.** Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**, s. 18 (4): 657-686.
82. **Philippon A, Arlet G, Lagrange PH.** Origin and impact of plasmid mediated extended- spectrum beta lactamases. *Eur J Clin Microbial Infect Dis*, **1994**, s. 13(1): 17-29.
83. **Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND.** Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M-beta-Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**, s. 42(12): 5715-5721.
84. **Poirel L, Naas T, Thomas LI, Karim A, Bingen E ve ark.** CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, s. 45(12): 3355–3361.
85. **Pool K.** Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, **2004**, s. 61(17): 2200-2223.
86. **Power P, Radice M, Barberis C, Mier C, Mollerach M ve ark..** Cefotaxime-hydrolysing beta-lactamases in *Morganella morganii*. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*, **1999**, s. 18(10): 743–747.
87. **Rahal JJ.** Extended-Spectrum Beta-lactamases: How big is the problem. *Clin Microbiol Infect*, **2000**, s. 6(2): 2-6.
88. **Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML ve ark.** Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla*ACME) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **1999**, s. 43(9): 2193–2199.
89. **Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C.** The spread of CTXM- type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*, **2008**, s. 14(1): 33-41.
90. **Sabate M, Tarrago R, Navarro F, Miro E, Verge's C ve ark. ..** Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**, s. 44(7): 1970–1973.
91. **Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, ve ark.** Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. *J Clin Microbiol*, **1996**, s. 34(12): 2997–3001.
92. **Sirost D, Sirost J, Labia R.** Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, **1987**, s. 20(3): 323–334.
93. **Sougakoff W, Goussard S, Courvalin P.** The TEM-3 beta-lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett*, **1988**, s. 56: 343–348.

94. **Stürenburg E, Mack D.** Extended spektrum beta lactamases: İmplications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect*, **2003**, s. 47(4): 273-295.
95. **Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF.** Detection and Reporting of Organisms Producing Extended-Spectrum b-Lactamases: Survey of Laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol*, **1999**; s. 37(12): 4065–4070.
96. **Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW ve ark.** Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum β -Lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with Isolates Collected during Project ICARE. *J Clin Microbiol*, **2003**, s. 41(7): 3142–3146.
97. **Thomson KS, Sanders CC.** Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*, **1992**, s. 36(9): 1877–1882.
98. **Thomson KS, Sanders CC.** A simple and reliable method to screen isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for the production of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*, **1997**, s. 3(5): 549–554.
99. **Tzouvelekis LS, Bonomo RA.** 1999. SHV-type Beta-lactamases. *Curr Pharm Des*, **1999**, s. 5(11): 847–86.
100. **Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H.** Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol*, **1997**, s. 35(9): 2191–2197.
101. **Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP.** Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, **2008**, s. 62(2): 284-288.
102. **Yüce A.** Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klimik dergisi*, **2001**, s. 14(2): 41-46.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana'da doğdu. Ortaöğrenimini Kasım Sacide Ener İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Hacı Ahmet Atıl Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında kazandığı Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat-Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.