

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA* SPP.
SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ
(GSBL) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esmâ CEYLAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR

ŞANLIURFA

2015

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA* SPP.
SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ
(GSBL) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esmâ CEYLAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 12191 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2015

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Esmâ CEYLAN'ın hazırladığı "Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella spp. Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Sıklığının Araştırılması" konulu çalışma 13.10.2015 tarihinde jüriler tarafından değerlendirilerek Tıbbi Mikrobiyoloji programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Sami TAŞÇI

Başkan



Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR

Danışman



Yrd. Doç. Dr. Nerime YENTÜR DONİ

Üye

ONAY



TEŞEKKÜR

Her türlü desteği ile yüksek lisans öğrenciliği eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bize aktararak bizi yetiştiren, oluşturduğu hoşgörü ortamında huzurlu çalışmamızı sağlayan danışman hocam Prof.Dr. Mehmet BAYRAKTAR'a,

Yüksek lisans öğrenciliği eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları ve emekleri olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli hocalarım Prof.Dr. Sami TAŞÇI, Prof.Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e,

Laboratuvar tez çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen sevgili Ali KÜÇÜK, Emine KILIÇ ve Cengiz ALTUN'a,

Çalışmamın istatistiksel analiz bölümünde yardımlarını esirgemeyen; Uzm.Dr. Hadice ÖZÇINAR, Uzm.Dr. Ayşenur VARIŞLI, Araş.Gör. Gülcan GÜRSES ve Bio. Eyyüp KAYA'ya,

Bulduğum süre içerisinde, sağladıkları huzurlu iş ortamı ve her türlü desteklerinden dolayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Esmâ CEYLAN

2015

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Klebsiella</i> cinsi bakteriler	3
2.2. Beta-laktam antibiyotikler	6
2.2.1. Penisilinler	6
2.2.2. Sefalosporinler	7
2.2.3. Monobaktamlar	7
2.2.4. Karbapenemler	8
2.2.5. Beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktamlar	8
2.3. Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları	8
2.3.1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi	9
2.3.2. Penisilin bağlayan protein değişimleri	10
2.4. Beta-laktamazlar	11
2.4.1. Beta-Laktamazların isimlendirilmesi	11
2.4.2. GSBL'lerin Tarihçesi	14
2.4.3. GSBL tipleri	16

2.4.3.1. TEM'den köken alan GSBL'ler	16
2.4.3.2. SHV'den köken alan GSBL'ler	16
2.4.3.3. OXA'dan köken alan GSBL'ler	17
2.4.3.4. CTX-M	17
2.4.3.5. Diğer sınıf A GSBL'ler	18
2.4.3.6. İnhibitör dirençli geniş spektrumlu beta-laktamazlar	18
2.4.4. Güncel önem taşıyan beta-laktamaz grupları	19
2.4.4.1. Bush Grup 1 kromozomal enzimler (AmpC)	19
2.4.4.2. Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar	19
2.4.5. GSBL'lerin epidemiyolojisi	20
2.4.6. GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunlar	20
2.4.7. GSBL'lerin laboratuvar tanısı	22
2.4.7.1. GSBL tarama testleri	22
2.4.7.2. GSBL doğrulama testleri	22
2.4.7.2.1. Çift disk sinerji testi	23
2.4.7.2.2. Kombine disk yöntemi	24
2.4.7.2.3. Üç boyutlu test	24
2.4.7.2.4. Dilüsyon yöntemleri	24
2.4.7.2.5. E Test yöntemi	24
2.4.7.2.6. Otomatize sistemler	25
2.4.7.2.7. Moleküler yöntemler	25
2.4.7.2.8. Hızlı tanı yöntemleri	26
2.4.8. GSBL sentezleyen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların Tedavisi	27
2.4.9. GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarının önlenmesi	28

3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan besiyerleri ve diğer malzemeler	29
3.1.1. Kanlı Agar	29
3.1.2. Eozin metilen blue agar	30
3.1.3. Mueller hinton agar	30
3.1.4. Triple sugar iron agar	31
3.1.5. Simmon's sitrat agar	32
3.1.6. SİM medium	32
3.1.7. Christensen üre agar	33
3.1.8. Kullanılan antibiyotikler	34
3.1.9. Kullanılan diğer gereçler	34
3.2. Bakteri izolasyonu ve tanımlanması	35
3.2.1. Biyoşimik testlerle tanımlama	35
3.2.1.1. TSI besiyerinin değerlendirilmesi	36
3.2.1.2. Sitrat besiyerinin değerlendirilmesi	37
3.2.1.3. Christensen üre agar besiyerinin değerlendirilmesi	37
3.2.1.4. SİM (Sülfid-İndol-Motilite) besiyerinin değerlendirilmesi	37
3.2.2. APİ 20 E ile tanımlama	38
3.2.3. İzole edilen suşların saklanması	38
3.3. Antibiyotik duyarlılığının araştırılması	39
3.3.1. Disk Diffüzyon Testi	39
3.4. GSBL varlığının araştırılması	41
3.4.1. Çift disk sinerji testi	41
3.4.2. E Test	42

4. BULGULAR	44
4.1. Epidemiyolojik bilgiler	44
4.2. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları	48
4.3. GSBL tarama ve doğrulama testlerinin sonuçları	49
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no

Şekil-1: GSBL varlığının cinsiyetlere göre dağılımı	46
Şekil-2: GSBL varlığının çocuk ve erişkin yaş gruplarına göre dağılımı	46
Şekil-3: GSBL varlığının YBÜ ve kliniklere göre dağılımı	47
Şekil-4: Çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif ve negatif örneklerin antibiyotiklere direnç oranları (%)	50



TABLolar DİZİNİ

Sayfa no

Tablo-1: <i>Klebsiella</i> 'ların önemli biyokimyasal özellikleri	4
Tablo-2: Beta-laktamaz sınıfları	13
Tablo-3: GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri (NCCLS)	22
Tablo-4: GSBL varlığını saptamak için kullanılan yöntemlerin üstünlüklerini karşılaştırılması	27
Tablo-5: Kirby Bauer Disk Difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları	40
Tablo-6: GSBL varlığının soyutlanan <i>Klebsiella</i> türlerine göre dağılımı	44
Tablo-7: GSBL varlığının suşların soyutlandığı klinik örneklerle göre dağılımı	45
Tablo-8: <i>Klebsiella</i> spp. suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	48
Tablo-9: DDT ile doğrulama testlerinin karşılaştırılması	49

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa no

Resim-1: EMB besiyerinde üreyen <i>K.pneumoniae</i>	35
Resim-2: TSİ besiyeri	36
Resim-3: Sitrat pozitif	37
Resim-4: Üreaz pozitif	37
Resim-5: SİM besiyeri	38
Resim-6: Disk difüzyon testi	39
Resim-7: ÇDST pozitif	41
Resim-8: E Test pozitif	42
Resim-9: E Test negatif	42

KISALTMALAR VE SİMGELER

GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
H₂S	: Hidrojen sülfür
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat Derece
pH	: Asidite
APA	: Aminopenisilanik Asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Proteinler
IRT	: İnhibitör Rezistan TEM
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
CYBÜ	: Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi
ÇDST	: Çift Disk Sinerji Testi
DYBÜ	: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi
EMB	: Eozin Metilen Blue
ESBL	: Extended-Spectrum beta-lactamase
GCS	: Genel Cerrahi Servisi
GCYBÜ	: Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi
KCYBÜ	: Kalp Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi
KDT	: Kombine Disk Testi

KİT	: Kemik İligi Transplantasyon Ünitesi,
KYBÜ	: Kardiyoloji Yoğun Bakım Ünitesi
MİO	: Motility-İndol-Ornitin
MİL	: Motility-İndol-Lysine
PYBÜ	: Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi
R	: Dirençli
S	: Duyarlı
TSI	: Triple Sugar Iron
TSN	: The Surveillance Network
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

ÖZET

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA* SPP. SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Esmâ CEYLAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Amaç: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) gram negatif bakterilerde beta-laktam direncinin en önemli sebebidir. GSBL üreten bakteriler, hastanelerde salgınlar oluşturabilmekte, tedavilerin yetersiz kalmasına, hastaların hastanede yatış sürelerinin uzamasına ve mortalite oranlarının yükselmesine yol açabilmektedir. Çalışmamızda; çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.oxytoca*, *K.pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılığı, GSBL sıklığı, yaş ve cinsiyetle ilişkisi, GSBL oranlarının servislere göre dağılımını tespit etmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ocak 2014 - Haziran 2015 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesinde yatan hastaları kapsamaktadır. Çeşitli klinik örneklerden 13'ü *K.oxytoca* ve 87'si *K.pneumoniae* olarak tanımlanan toplam 100 suş izole edildi. İdentifikasyonda APİ 20E testi kullanıldı. İzole edilen suşların; Amoksisilin-Klavulanat, İmipenem, Piperasilin/Tazobaktam, Amikasin, Siprofloksasin, Gentamisin, Sefotaksim, Trimetoprim/Sülfometoksazol, Seftriakson, Seftazidim duyarlılıkları disk diffüzyon yöntemiyle araştırıldı. GSBL varlığının tespiti için çift disk sinerji testi ve E test yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: GSBL oranı *K.oxytoca*'da %46.1 (n=6), *K.pneumoniae*'de %56,3 (n=49) olarak bulundu. GSBL üreten suşların oranı erişkin hastalarda %38 (n=38), pediatrik hastalarda %17 (n=17) olarak tespit edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). GSBL üreten suşların oranı sırasıyla erkek hastalarda %31 (n=31), kadın hastalarda %24 (n=24) olarak tespit edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p >0.05). GSBL oranını yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve pediatri servisinde yatan hastalarda yüksek oranda bulundu.

Suşların duyarlılıkları disk diffüzyon testi (DDT) ile araştırıldı. Genel olarak Trimetoprim-Sülfometaksazol, üçüncü kuşak Sefalosporinler ve Aztreonam'a direnç saptanırken, en az direnç İmipenem'de görüldü. Suşların hiçbirinde Karbapenem direncine rastlanmadı.

DDT yöntemi ile 100 suşun 67'si Seftazidim, Seftriakson, Sefotaksim ve Aztreonam yönünden GSBL şüpheli bulundu. Bu izolatlara doğrulama testi olarak ÇDST ve E-test uygulandı. GSBL pozitiflikleri arasında karşılaştırma yapıldı. şüpheli izolatların; ÇDST ile 55'inde ve E-test ile 55'inde GSBL pozitifliği saptandı.

Sonuç: *Enterobacteriaceae* izolatları için yapılan rutin antibiyotik dirençlilik testlerine, GSBL testinin eklenmesi önerilir.

Bu sonuçlar, hastanemizde etkili sürveyans çalışmalarının planlanmasının, doğru antibiyotik kullanımının ve hasta izolasyon önlemlerinin önemli olduğunu bir kez daha hatırlatmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella*, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL), ÇDST, E-test

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE FREQUENCY OF ESBL PRODUCING *KLEBSIELLA* SPP. ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL SAMPLES

Esma CEYLAN

Master Thesis, Department of Medical Microbiology

Objective: Extended spectrum β -lactamases are the most frequent cause of resistance to betalactam antibiotics in gram negative bacteria. ESBL positive bacteria may cause hospital epidemics, treatment failure, elongated hospital stay, and increased mortality. In the present study, we aimed to evaluate antibiotic sensitivity and ESBL positivity among *K.pneumoniae* and *K.oxytoca* strains isolated from various clinical samples, its frequency, its association with age and gender, its distribution in different clinics.

Material and Method: January 2014 to June 2015, Total of 100 strains of *Klebsiella* (87 *K.pneumoniae*, 13 *K.oxytoca*) were included in the study. These strains isolated from samples submitted to our lab from various clinics and intensive care units (ICU) of Harran University Hospital. Conventional methods and Api 20E were used for identification. Kirby Bauer disk diffusion test (DDT) for determining antimicrobial susceptibility. The following antimicrobials were tested: amoxicilline-clavulanate, imipenem, piperacillin/tazobactam, amikacin, ciprofloxacin, gentamicin, cefotaxime, ceftriaxon ceftazidime and trimethoprim/sulfamethoxazole. Double disc synergy (DDS) and E-tests were used for determination and confirmation ESBL positivity.

Results: ESBL positivity was found to be in *K.pneumoniae* (n=49; 56.3%) and *K.oxytoca* (n=6; 46.1%). These values in adult and pediatric patients were (n=38; 38%), (n=17; 17%) respectively with significant statistical difference ($p < 0.05$). Regarding gender, the percentage of ESBL producing strains in male and female patients (n=31; 31%), (n=24; 24%), respectively with no significant statistical difference ($p > 0.05$). The high proportion of patients were from ICU and pediatric clinics.

In general, antimicrobial susceptibility results were as high resistance rates (80%) were detected against trimethoprim/sulfamethoxazole, third generation cephalosporins and

aztreonam whereas the least resistance (**1%**) was observed to imipenem among *Klebsiella* negative ESBL strains. Carbapenem resistance was never seen.

Sixty seven out of total **100** tested strains were found to be positive ESBL by DDT, but in conducting DDST and E-tests **55** strains were found to be really positive ESBL ones.

Conclusion: The overall ESBL positivity among *Klebsiella* species in our hospital is **55%**. Carbapenem and imipenem may be the most effective drug in treating infections caused by *Klebsiella* positive ESBL strains. ESBL determination in members of *Enterobacteriaceae* isolates should be routinely done in order to achieve proper therapy.

Keywords: *Klebsiella*, Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL), Double Disc Synergy Test (DDST), E-test

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç konusu tüm dünyada önemli bir sorun olmaya başlamıştır (1). Beta laktamlar, gösterdikleri üstün etki spektrumları, mikroorganizmalar için yüksek ve seçici toksisiteleri, neredeyse tüm yaş gruplarında uygulanabilir olmaları, diğer gruplara göre relatif olarak düşük yan etki insidansları ve tüm vücut sıvılarına olan üstün dağılım özellikleri nedeniyle günümüzde en çok reçete edilen antibiyotikler olmuştur. Lisanslı tüm antibiyotikler içinde bu ilaçların sayısal ağırlığı %70'e yakındır. Ancak, gereksiz-uygunsuz-yoğun kullanım ve hastanelerde enfeksiyon kontrol yöntemlerinin yeteri kadar uygulanmaması nedeniyle bakterilerin bu antibiyotiklere olan direnci yıllar içinde hızla artmıştır (2). Antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki ilişkiye gösterilebilecek en iyi örneklerden biri, yeni beta laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımını takiben bakterilerin bu antibiyotiklere direnç geliştirmeleridir. Gram negatif bakterilerde beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir (1). Beta laktamazlar; beta laktam antibiyotiklerin beta laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayarak antibakteriyel etkisini ortadan kaldıran enzimler olup, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türü tarafından sentezlenebilir (3). Beta laktam antibiyotiklerin etki spektrumlarının genişliği nedeniyle, bunların hidrolizine yol açan beta laktamazlar da "genişlemiş spektrumlu" ön adıyla adlandırılırlar. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), mikrobiyolojik olarak oksiminio sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır (1).

Bugüne kadar 500'den fazla beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır. En önemli betalaktamaz enzim grupları plazmidlerle kodlanan sefalosporinaz, metallo betalaktamaz ve GSBL'lerdir. Beta laktamazların yaklaşık 200 kadarı GSBL'ler olup plazmidik özellikleri nedeniyle bakteriler arasında transfer edilebilir (3, 4). GSBL'ler ilk defa 1983 yılında Almanya'da *K.pneumoniae* türlerine karşı geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasından hemen sonra bulunmuştur (5, 6). En sık *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında bulunmakla birlikte *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ve *Morganella* gibi gram negatif basillerde de nadir olarak tespit edilmektedir (5).

GSBL prevalansının ülkeler, şehirler, hastaneler arasında değiştiği, hatta aynı hastanedeki servisler arasında dahi farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (7). Yapılan çalışmalarda *Klebsiella* spp. izolatlarında GSBL oranı Latin Amerika'da %42.7, Avrupa'da %21.7, Kuzey Amerika'da %5.8 olarak bildirilmiştir (8). Son yıllarda ülkemizde GSBL pozitifliği *Klebsiella* spp. izolatlarında %42-56.5 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir (9, 10).

GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlar: sıklıkla hastanede uzun süre yatan, büyük cerrahi operasyon geçiren, arteriyel ve üriner kateteri olan ve özellikle yoğun bakım servislerindeki hastalarda görülmektedir. Ancak son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlarda da sıklığının arttığı görülmüştür (11).

GSBL enzimleri plazmid aracılığıyla kolay yayıldıklarından salgınlara yol açabilirler. Bu suşların etken olduğu enfeksiyonlarda tedavi başarısızlığı ve mortalite artışı gibi ciddi klinik problemlerin ortaya çıkışı nedeniyle günümüz hastanelerinde önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Bu nedenle bu enzimlerin laboratuvarda iyi tanımlanması tedavinin doğru yönlendirilmesi bakımından önem taşır.

Bu araştırmamızın, hastanemizdeki *Klebsiella* spp. izolatlarının, direnç profilinin ve GSBL oranlarının belirlenmesi ile özellikle uygunsuz antibiyotik kullanımı nedeniyle çoklu direnç gösteren suşların giderek artışının önlenmesine, enfeksiyonlarının daha hızlı etkin tedavi edilmesine ve uygunsuz antibiyotik kullanımının engellenmesine katkıda bulunması amaçlandı. Bu amaçla Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* spp. izolatlarının GSBL oranları belirlendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Klebsiella cinsi bakteriler

Toprakta, sulara, insan ve hayvanların barsakları ile üst solunum yolu normal florasında bulunurlar. *Enterobacteriaceae* ailesinin özelliklerini gösteren hareketsiz, sporsuz, çoğunlukla kapsüllü, 0.7 –1.5 x 2.0–5.0 µm boyutlarında, bazen ikişer bazen kısa zincir oluşturan basil şeklinde bakterilerdir. Gram negatif olup bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar. Kapsül, organizmadan yeni ayrılan ve hastalık materyali içindeki bakterilerde açık seçik ve geniş olarak görülür. Kanlı, serumlu besiyerlerinde kapsüllerini saklı tutarlar. En iyi glikozlu besiyerlerinde kapsülendirler (12).

Klebsiella tüm barsak bakterileri gibi genel kullanım besiyerlerinde kolayca ürerler. Ortalama pH 7 ve 37°C üremeleri için en iyi ortamdır. Buyyon gibi sıvı besiyerlerinde homojen bir bulanıklık ve dipte muköz bir çöküntü yaparak ürerler. Katı besiyerlerindeki kolonileri tipik mukoid nitelikte, büyük, sarımtırak gri renkte ve akıcı kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda S ve R kolonilerine dönüşebilirler. Aerop ve fakültatif anaerop olup ürediği ortama bol kapsül maddesi salarlar (12).

Başta glikoz olmak üzere mannitol, salisin, adonitol, inozitol ve sorbitolden, çoğu kez de laktoz ve sukrozdan gaz yapmak suretiyle birçok şekeri parçalarlar. Nişastadan gaz oluşturmaları önemli bir özelliktir. Hidrojen sülfür (H₂S) yapmazlar. Özellikle solunum sisteminden ayrılan bazı suşlar değişik biyokimyasal reaksiyonlar verebilir. *Klebsiella*'lar fenilalanini deamine etmez, az bir kısmı dışında jelatinaz, ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar (Tablo 1) (12, 13).

Tablo-1: Klebsiella'ların önemli biyokimyasal özellikleri

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Klebsiella planticola</i>
Metilen kırmızısı	-	+	+	-	+	D
İndol	-					D
Voger proskauer	+	-	-	+	+	+
Sitrat	+	D	-	+	+	+
45°C'de laktozdan gaz	+			-	-	-
+10°C'de üreme	-	-	-	+	+	+
Laktoz	+	G	G	+	+	+
Malonat	+	-	+	D	D	+
Üreaz	+	D	-	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+
Arjinin	-	D	-	-	-	-
H ₂ S	-			-	-	-

Açıklama: (+) olumlu, (-) olumsuz, (D) değişken, (G) gaz oluşturma

Klebsiella ısıya dayanıksızdır ve nemli ısıda 55°C’de yarım saatte ölürlür. Ancak kuruluğa karşı oldukça dirençli olup özellikle organik maddeler içinde kurutulursa aylarca canlı kalabilirler. Oda ısısında tutulan kültürlerde haftalarca,+4°C’de soğukta aylarca canlı kalabilir. Hastane ortamından izole edilen suşlarda dirençlilik düzeyi çok yüksektir. *Klebsiella*’da lipopolisakkarit yapısında ‘K’ (kapsül) ve ‘O’ (somatik) antijenleri bulunur. Serolojik tiplendirilmeler bu antijenlere göre yapılır. Bu antijenlere karşı elde edilmiş anti serumlarla lam ve tüp aglutinasyonları, kültür süzüntüsü ile presipitasyon ve Neufeld’in kapsül şişme reaksiyonları ile *Klebsiella*’lar tiplendirilebilir. Kapsül şişme reaksiyonunda aslında özgül serumlarla karşılaştırılan bakterilerin kapsül polisakkaritlerinde oluşan presipitasyon sonucunda kapsül periferinde opak bir çevre oluşmakta olup kapsül şişmiş gibi görülmektedir. Bu deneylerle *Klebsiella*’nın 82 K tipi antijeni gösterilmiştir (12).

Klebsiella sağlıklı insanların %5’inin barsak ve üst solunum yolları florasında bulunur. Bakteriyel pnömonilerin yaklaşık %2’si bu bakteriler tarafından meydana getirilir. Akciğerlerde nekroz ve hemorajik konsolidasyonlarla seyreden ağır bir pnömoniye neden olurlar. Bunun dışında idrar yollarına, prostat, periton, meninksler, kulak ve sinus boşlukları gibi organlara yerleşerek ve kanda yayılarak çeşitli tipte ve ağırlıkta enfeksiyonlara neden olurlar. Kapsülün patojenlikle ilişkisi kesin değildir. *Klebsiella*’nın serbest bir toksini yoktur. Bununla beraber kültür süzüntüleri bazı hayvanlarda ölüme kadar götürebilen hemorajik lezyonlar yapmaktadır. Bazı *Klebsiella*’larda enterotoksin saptanmıştır. Bazı suşları R plazmidlerini kolayca kabul eder ve bu şekilde antibiyotiklere karşı çoğul direnç kazanır (12).

Üst solunum yolu ve barsak florasında bulunabilen *Klebsiella*’ların buldukları yerde uygun koşulların oluşması veya yerini değiştirerek diğer organ ve sistemlere yerleşmeleri halinde birçok hastalığa neden olurlar. Son zamanlarda özellikle hastane ortamlarında antibiyotiklere karşı direnç kazanmış suşların yaptığı hastane enfeksiyonları yüzünden bu bakterilerin önemi artmıştır. Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında yeni sefalosporinlerin ya da diğer deyimle genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin (oksiimino sefalosporinler) oldukça fazla kullanılması genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL)’in oluşmasına neden olmuştur. GSBL ilk kez 1983 yılında Almanya’da bir *K.pneumoniae* suşunda tanımlanmış olup bu enzime SHV–2 adı verilmiştir (14).

Klebsiella 'ların neden olduğu pnömoniler bakteriyel pnömonilerin %2'sini oluşturur. Daha çok 2 yaşından küçük ve 40 yaşından büyük kişilerde görülür. Çeşitli nedenlerle vücut direncinin kırılması, virüslere bağlı olanlar başta olmak üzere çeşitli üst solunum yolu enfeksiyonları hazırlayıcı faktör olarak etki yapar. *Klebsiella* 'lara bağlı idrar yolu enfeksiyonları özellikle hastane ortamında artış göstermektedir. Piyelit, piyelonefrit ve sistit şeklinde ortaya çıkan bu tip enfeksiyonlar tedaviye oldukça direnç göstermektedir. *Klebsiella* 'lar, bu hastalıkların dışında ve daha az olmak üzere prostatit, otitis media, sinüzit, kolesistit, peritonit, anjin, menenjit ve daha az olmak üzere sepsis, karaciğer apsesi ve çeşitli organ hastalıkları yapar (12).

2.2. Beta laktam antibiyotikler

Beta laktam grubu antibiyotikler etkilerini peptidoglikan sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak gösterir (15). Beta laktam antibiyotikler yaygın olarak kullanılan bakterisid etkili ve toksisiteleri düşük olan ilaçlardır. Bu gruptaki antibiyotiklerin ortak özellikleri yapılarında beta laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır (16).

Her grup beta laktam antibiyotigin özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlarda beta laktam halkasına bağlanan başka halka bulunmamaktadır. Beta laktam antibiyotikler 5 grupta toplanabilir (17).

- a) Penisilinler
- b) Sefalosporinler
- c) Monobaktamlar
- d) Karbapenemler
- e) Beta laktamaz inhibitörlü (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam) beta laktamlar.

2.2.1. Penisilinler

Penisilinlerin temel yapısı, bir tiazolidin halkası, bir beta laktam halkası ve bir yan zincirden oluşur. Beta laktam ve tiazolidin halkasının oluşturduğu yapı 6- aminopenisilanik asit (APA) adını alır ve esasen tüm penisilinler 6-APA türevidir.

Antibakteriyel etkiyi beta laktam halkası sağlar. Hücre duvarındaki peptid zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturan transpeptidazlar, karboksipeptidazlar, endopeptidazlar olan penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak bakteri hücre duvar yapımının transpeptidasyon basamağını inhibe edip peptidoglikan çatının yapımını önlerler. Penisilin grubu antibiyotikler, antimikrobiyal aktivitelerine göre 5 grupta sınıflandırılabilir (17).

a) Doğal penisilinler: Prokain penisilin G, Penisilin G, Benzatin Penisilin G, Kristalize Penisilin G, Penisilin V (Fenoksi Metil Penisilin).

b) Amino penisilinler: Ampisilin, Amoksisilin, Bakampisilin, Siklasilin, Episilin,

c) Penisilinaza dayanıklı penisilinler: Metisilin, Nafsilin, İzaksazolil Penisilin, Kloksasilin, Dikloksasilin, Flukloksasilin, Oksasilin.

d) Üreido penisilinler: Azlosilin, Mezlosilin, Piperasilin.

e) Karboksi penisilinler: Karbenisilin, İndanil Karbenisilin (korindasilin), Tikarsilin.

2.2.2. Sefalosporinler

Penisilinlerden beş üyeli tiazolidon halkası yerine, altı üyeli dihidrotiazin halkasının (sefem çekirdeği) olmasıyla ayrılır. Bu halka sefalosporinlerin beta laktamazlara karşı daha stabil olmasını sağlar. PBP'lere bağlanarak hücre duvar sentezini önler ve bakterisidal aktivite gösterir. Sefalosporinlere direnç, beta laktamaz yapımı, bakteri hücre duvar geçirgenliğinin azalması ve PBP'lerde modifikasyon olmak üzere başlıca 3 mekanizmayla gelişir. Sefalosporin direncine en sık yol açan mekanizma beta laktamaz yapımıdır. Sefalosporinlerin beta laktamazlara karşı stabilitesi farklılık gösterir. Sefalosporinler gram negatif bakteri hücre duvarından, protein yapısında, porin adı verilen su dolu kanalları kullanarak geçer. Porinlerin sayısında veya çapında olan değişiklikler bakteriyel direnç ile sonuçlanır.

2.2.3. Monobaktamlar

Monosiklik beta laktam halkasından oluşur. Monobaktamlar içerisinde tek klinik kullanımı olan antibiyotik *Chromobacterium violaceum*'dan üretilen aztreonamdır. Aztreonam, sentetik ve yalnızca parenteral kullanılan, yalnızca gram negatif bakteriler üzerine etkisi olan bakterisid etkili monobaktam bir antibiyotiktir. Gram negatif bakterilerin hücre zarından geçer ve PBP'lere bağlanarak etkisini gösterir. Plazmid ve kromozomal beta

laktamazların çoğuna ve sınıf B enzimlerinin hidrolizine karşı dirençlidir. Üçüncü kuşak sefalosporinleri inaktive eden sınıf C beta laktamazlar tarafından inaktive edilir.

2.2.4. Karbapenemler

En geniş spektruma sahip beta laktam grubu antibiyotikler olup, tıbbi kullanıma girmeleri 1970'li yılların ortalarında Tienamisin'in bulunmasıyla başlamıştır. Karbapenemler diğer beta laktamlar gibi hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. Geniş etki spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta laktamazlara karşı dirençli olmaları ve indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantlarının seçimine meydan vermemeleri önemli avantajlarıdır.

2.2.5. Beta laktamaz inhibitörlü beta laktamlar

Beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmiş beta laktam antibiyotiklerdir. Bunlar pratik olarak klavulanik asit ile kombine edilmiş amoksisilin ve tikarsilin, sulbaktam ile kombine edilmiş ampisilin ve sefoperazon, tazobaktam ile kombine edilmiş piperasilindir (ampisilin sulbaktam, amoksisilin klavulonat, tikarsilin klavulonat, piperasilin tazobaktam). Sık rastlanan toplum kaynaklı infeksiyonlarda beta laktamazlardan dolayı artan direncin aşılmasında tercih edilen bileşiklerdir.

2.3. Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Beta laktam grubu antibiyotikler, etkilerini hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazları (PBP) inhibe edip hücre duvar sentezini durdurarak gösterir (15, 18). Bir beta laktam antibiyotiğinin etki gösterebilmesi için, eğer varsa dış zardan ve periplazmik aralıktan geçmesi, hücre zarındaki PBP'lere etkin konsantrasyonda ulaşması ve bu enzimlere bağlanması gereklidir (15). Beta laktamlara direnç gelişimine neden olan mekanizmalar, ilacın beta laktamazlarca parçalanması, hedef PBP değişimleri ile ilacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasını engelleyen porin değişikliklerine bağlı geçirgenlik azalması ve/veya aktif pompa (efluks) sistemleridir. Bunlardan ilki ve sonuncusu gram negatif bakterilerde daha sık görülmektedir (15). Dirençli bakteriler bu basamakların her birinde beta laktam ilaçlar için bir engel oluşturabilir. Örneğin,

gram negatif bakteriler porin kanallarını kapatarak geçişi zorlaştırabilir ve/veya periplazmik aralıktaki beta laktamazlar beta laktam antibiyotiği parçalayabilir, bazı bakteriler beta laktamların iyi bağlanamadığı yeni veya değişmiş PBP'ler eksprese edebilir (15). Bu mekanizmaları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

2.3.1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi

Bu durum, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilir (15, 19).

a) Dış membran porin değişimleri: Küçük hidrofilik moleküller gram negatif bakterilerin dış zarından ancak içi su dolu kanalcıklar olan porinler aracılığı ile geçilebilir (17). Antibiyotiklerin porinlerden geçişi; şekli, büyüklüğü, yükü ve hidrofilik özelliklerine bağlı olarak belirlenir. Bu nedenle, porin proteinlerinin yapısında veya iyonik yükte meydana gelebilecek değişiklikler veya özel porinlerin kaybı, hidrofilik moleküllerin girişini engellemektedir. Dış membranın özel bir beta laktama karşı geçirgenliğinin az olması o mikroorganizmanın doğal bir özelliğidir ancak geçirgenliğin antimikrobiyal tedavi sırasında azalması sonradan porin proteinlerinde bir değişim meydana geldiğini gösterir. Beta laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler içerdikleri için porin proteinlerdeki değişimlerden etkilenmektedir (15, 20). Dirençli suşlarda porin kaybının yanısıra aktif pompa sistemleri veya beta laktamazın aşırı üretimi gibi 2. bir mekanizma daha vardır. Hem aktif pompa sistemleri hem de beta laktamazlar dış membrandan az ve yavaş geçen substratların üzerinde daha kolay etki göstererek direnç düzeylerini artırır. Örneğin, sefoksitine dirençli *E.coli* suşlarının çoğunda, bu direncin OmpF kaybı ile AmpC tipi enzimlerin aşırı üretiminin sinerjik etkilerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (21, 22).

K.pneumoniae suşlarında ise bu direncin bir dış membran porini olan OmpK35 kaybı ile moleküler sınıf A beta laktamazların aşırı üretiminin sinerjik etkilerinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

b) Aktif pompa (efluks) sistemleri: Antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sistemleri beta laktamların da aralarında bulunduğu birçok antibiyotik sınıfına karşı doğal veya kazanılmış direncin gelişmesinde önemlidir. Hatta gram negatif bakterilerde

çeşitli antibiyotiklere doğal direncin gelişmesinde temel rolün eskiden sanıldığı gibi dış membranın değil, aktif pompa sistemlerinin oynadığı belirlenmiştir (15, 23). Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direnç gelişimine neden olur. Örneğin, *P.aeruginosa* suşlarında, bir beta laktam ile tedavi sırasında, MexABOprM ve/veya diğer 3 elemanlı pompa sistemlerini kontrol eden regülatör genlerdeki mutasyon ve pompa sistemlerinin aktivasyonu sonucunda, bu suşlar sadece beta laktamlara değil aynı zamanda kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklinler, trimetoprim de dirençli hale gelmektedir (23).

2.3.2. Penisilin bağlayan protein değişimleri

PBP'ler yapısal olarak beta laktamlara çok benzeyen D, D-transpeptidazlar ve D, D-karboksi-peptidazlardır. Hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır (15). Aktif bölgelerinde bir serin aminoasiti bulunduğu için serin proteazlar arasında yer alırlar. PBP'ler moleküler ağırlıklarına göre 1-4 arası sayılar ile adlandırılırlar. Aynı molekül ağırlığında birden fazla PBP varsa o zaman sayıların yanına harfler eklenir (PBP1a gibi). Değişik PBP'lerin farklı beta laktamlara bağlanma afiniteleri ve etkilendikleri ilaç düzeyleri farklıdır. Bu durum antibiyotiklerin etkinliklerinin birbirinden farklı olmasının nedenlerindedir. Enzimin aktif bölgesi periplazmik kısımda yer almaktadır. Beta laktam ajanlar PBP'lerin substrat analoglarıdır. N-asetil muramik asit pentapeptid ünitesinin son kısmında yer alan D-alanil-D-alanin dipeptidine benzerler. Bu nedenle, PBP'ler aynen beta laktamazlar gibi beta laktamlara bağlanır ve çok yavaş bir şekilde beta laktamları hidrolize eder ve olay; geri dönüşümsüz bir açil-enzim kompleksi oluşması, ilacın açil türevinden ayrılamayan enzimin duvar sentezindeki görevini yapamaması, hücre duvar sentezinin durması ve yapım-yıkım dengesinin yıkım yönünde bozulması ile sonlanır. Beta laktam antibiyotikleri eş zamanlı olarak birden fazla PBP'i inaktive ederek etki gösterir. Özellikle yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin inhibisyonu bakteri için ölümcüldür.

2.4. Beta-laktamazlar

Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağını, parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Beta laktamaz yapımı başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere gram negatif bakterilerin beta laktam direncindeki en önemli mekanizmadır. Bu enzimlerin genetik temeli kromozomlar, plazmidler veya transpozonlardır. Bu enzimler gram negatiflerde periplazmik aralıkta buldukları için beta laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar rol almaktadır. Bugün 600 civarında klinik olarak farklı önemi olan, beta laktamaz enzimi bulunmaktadır. Beta laktamaz enzimlerinin bazı özelliklerine göre çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bush, beta laktamazları biyokimyasal (substrat profili) özelliklerine, Ambler, aminoasit ve nükleotid dizilerine (Moleküler Sınıflama), Sykes ve Richmond, izoelektrik noktalarına göre sınıflandırmışlardır. Günümüzde A, B, C ve D olmak üzere 4 çeşit beta laktamaz enzimi bulunmaktadır (15, 24, 25).

2.4.1. Beta Laktamazların isimlendirilmesi

Beta laktamazların isimlendirilmesinde birden fazla yöntem ve faktör kullanılmaktadır. Bazı enzimler, hedef substratlarına göre (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), içerdikleri genlere göre (Amp, CepA), izole edildikleri bakterilere göre (AER, PSE), suşlara göre (P99), hasta isimlerine göre (TEM, ROB), hastane ismine göre (MIR, RHH), eyaletlere göre (OHIO), keşfeden kişilere göre (HMS) isimlendirilmiştir (26, 27). Ancak, bu isimlendirmelerden bazıları, günümüzde geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin; SHV, sülfidril variabl'dan kısaltılmış bir isim iken, günümüzde SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu açığa çıkmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas*'tan izole edilmiş olan PSE enziminin, artık *Enterobakteri*'lerde de bulunduğu bilinmektedir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma disiplinleri, Ambler ve Bush-Jacoby-Mederios sınıflandırmalarıdır (28). Ambler, beta laktamazları nükleotid dizilerine göre moleküler olarak sınıflandırmıştır (Tablo 2).

A Sınıfı: Plazmid kontrolünde olan penisilinazlar. Aktif bölgesinde serin aminoasiti taşırlar. Öncelikli olarak penisilinleri hidrolize ederler.

B Sınıfı: Aktivasyon için çinko veya bakır gibi divalan katyonlara gereksinim duyan metallo enzimlerdir. Klasik inhibitörlere dirençli olan bu enzimler, EDTA ve merkaptobileşikler gibi metal selatörleri ile inhibe olurlar. Karbapenemler başta olmak üzere neredeyse tüm beta laktam antibiyotikleri hidrolize edebilme potansiyelleri vardır. Ülkemizde henüz çok az sayıda tanınmasına rağmen, izole edilen suşların hemen hemen tüm beta laktam antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (29).

C Sınıfı: Kromozom kontrolünde olup sefalosporinaz aktiviteleri olan beta laktamazlardır (24, 25).

D Sınıfı: Oksasilini hidrolize eden enzimlerdir.

A, C ve D grupları aktif bölgelerinde SERİN içerir. Buna karşılık olarak, B grubu ÇİNKO bulundurur.

Bush ve arkadaşları, beta laktamazları substrat profilleri ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temeline göre 4 grupta toplamışlardır. Ancak bu grupların içerisinde bazı alt gruplar da yer almaktadır (Tablo 2) (28).

Tablo-2: Beta laktamaz sınıfları

Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması	Alt Gruplar	Moleküler sınıf (Ambler)	Substrat	Temel özellikler
Grup 1		C	Sefalosporinler	Genellikle gram negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidle de kodlanabilir). Klavulanik asit ile inhibe olmaz.
Grup 2		A, D		Birçoğu klavulanik asit ile inhibe olur.
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	Penisilinler Sefalosporinler	Genellikle gram negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM, SHV)
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) beta laktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden enzimler
	2d	D	Penisilin, Oksasilin	Oksasilini hidroliz eden klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan Sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, Karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren klavulanik asit ile inhibe olan enzimler.
Grup 3	3a, 3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok betalaktam	Metallo betalaktamazlar
Grup 4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

Tabloda görüldüğü gibi beta laktamazlar için yapılan sınıflandırmaya göre gram negatif bakteriler arasında hızla yayılan, hasta sağlığı ve tedavi maliyetleri açısından ciddi olumsuzlukların gelişmesine neden olan GSBL'ler A grubu enzimlerdendir.

2.4.2. GSBL'lerin Tarihçesi

Beta laktamazların tarihçesi, 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından bir *E.coli* suşunda bu antibiyotiği parçalayabilen bir penisilinazın gösterilmesi ile başlamaktadır. 1944 yılında Kirby, *S.aureus* suşlarından benzer nitelikte bir enzim elde etmiştir. Penisilin klinik tedaviye girmesini izleyen 20-25 yıl boyunca beta laktamazların sayısı ve çeşitleri oldukça kısıtlı kalmıştır. Bu dönemde gram negatif bakterilerin çoğunun TEM-1, *K.pneumoniae* suşlarının SHV-1 ürettiği görülmektedir. Ancak, 1978-1980 yıllarında, yeni beta laktam antibiyotiklerin (sefamisinler, karbapenemler, sulfonlar, monobaktamlar) kullanılmaya başlamasıyla beta laktamaz tiplerinin de hızla arttığı görülmektedir. Beta laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı, beta laktamazların evrimsel değişikliklere uğramasına, sayısı ve etki spektrumlarının çok ciddi boyutta artmasına neden olmuştur. 1995-2000 yılları arasında grup 1, 2be, 2br, 2d ve 3'deki enzim sayıları neredeyse 2 katına çıkmıştır. Penisilin G'yi hidrolizleyen, beta laktamaz (penisilinaz) üretimi ve bu gen plazmidle yayılmaktaydı. Gram negatiflere de etkili olan ampisilin gibi yarı sentetik penisilinler 1960'lı yıllarda, ardından da 1. kuşak sefalosporinler gündeme gelmiştir. Gram negatif bakterilerde 1963'lerin başlarından itibaren geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu plazmidik enzimler yoluyla temosilin dışında tüm penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinler inaktive edilmiştir. Bununla birlikte, 1970 lerin sonunda ve 1980'li yılların başında önce sefamisinler ve 2. kuşak sefalosporinler bulunmuştur. Ardından, gram negatiflere karşı daha etkili, 3. kuşak sefalosporinler kullanıma girmiştir. Geçen zamanla birlikte, gram negatif bakteriler beta laktamazlarını modifiye etmiş, TEM-1, TEM-2, SHV-1 de bir veya birkaç aminoasidi değiştirerek bu enzimlerin etki spektrumlarını biraz daha genişletmiş ve genişlemiş etkili beta laktamazları (GSBL) üretmeye başlamışlardır. En sonunda, ilk GSBL pozitif suş, *K.pneumoniae* olarak 1983'de Almanya'dan bildirilerek, literatürdeki yerini almıştır (15, 30).

İlk zamanlar GSBL pozitif bakteriler, gram negatiflere etkili tüm penisilinleri, 3. kuşak başta olmak üzere sefalosporinleri ve monobaktamları inaktive etmişlerdir. Son 20 yıldır

özellikle gram negatif bakterilerde sefalosporinlere dirençte öne çıkan mekanizma olan ve klinikte önemli bir sorun haline gelen GSBL'ler, *Klebsiella spp.* ve *E.coli*'lerde daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella spp.* ve *Shigella flexneri* de dahil, birçok enterik bakteride bildirilmiştir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *E.coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır (3). Bu enzimler bir iki aminoasit değişikliği ile dar spektrumlu beta laktamazlardan köken alırlar (31). Aktif bölgelerinde serin bulunan, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksım, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksimin sefalosporinleri hidroliz edebilen, klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan beta laktamazlardır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır. GSBL üreten bakteriler her zaman aminopenisilinlere (ampisilin veya amoksisilin), karboksipenisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin) ve üreido penisilinlere (piperasilin, mezlosilin) dirençlidir. GSBL üreten mikroorganizmalar çoğu kez aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer gruptaki antibiyotiklere de dirençlidir.

Bugüne kadar 500-600 beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların 200-300 tanesi GSBL'lerdir (5). Tanımlanan ilk GSBL üreten suşun seftazidim ve sefotaksimi belirgin değerlerde hidrolize eden klasik SHV-1 beta laktamazın bir mutant formu olduğu anlaşıldı. Bu sebeple bu enzime SHV-2 beta laktamaz adı verildi. Daha sonra bunu Fransa'dan ,TEM-2 beta laktamazdan genetik olarak sadece iki aminoasit farklı olan bir mutant enzim bildirisi takip etti (23). Bulunuşundan günümüze kadar GSBL'lerin sayısında ve çeşidinde hızlı bir artış dikkati çekmiştir. Bu enzimler enterik çomaklarda sınırlı kalmayarak *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi nonfermentatif etkenlere de yayılmıştır. Ülkemizde 1992 yılından beri GSBL'ler araştırılmakta ve bildirilmektedir. TEM ve SHV tip beta laktamazların mutant formu olan GSBL'ler, orijinal enzimlerin aksine geniş spektrumlu sefalosporinleri, aztreonamı ve diğer tüm penisilinleri hidrolize ederler. Ancak sefamisinler bu kuralın dışında kalır (5, 32, 33).

GSBL enzimleri hızla yayılmakta olup İngiltere, İspanya, Portekiz, İtalya Yunanistan, ABD, Kuzey Afrika, Güney Amerika, Japonya ve Çin başta olmak üzere hemen hemen tüm uzak doğu ülkelerinde tespit edilmiştir. SHV-2 ve SHV-5 Almanya'da, SHV-3, SHV-4 ve

TEM-3 Fransa'da, ve SHV-5 ise Yunanistan'da daha yaygın enzimlerdir. Önceleri TEM ve SHV tüm dünyada yaygın iken, günümüzde CTX-M tipi daha yaygın hale gelmiştir (2, 5).

2.4.3. GSBL tipleri

GSBL'lerin çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almışlardır. Günümüzde TEM türü beta laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta laktamazların sayısı 50'yi geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan (CTX-M, PER, VEB vs.) genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olmuştur (34, 35).

2.4.3.1. TEM'den köken alan GSBL'ler

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi 1987 yılında bildirilen TEM- 3 'tür (30, 36). GSBL fenotipi TEM enziminde, belirli pozisyonlarda oluşan aminoasit değişiklikleri ile meydana gelmektedir. TEM grubu beta laktamazlar *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır (30). Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1, gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin % 90'ında dirençten sorumludur. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup, ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere karşı dirence neden olur. Ancak oksiiimino sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. Bazı amoksisilin klavulanik asite dirençli *E.coli*'lerin nükleotid dizilerinin incelenmesi ile TEM beta laktamazlarındaki mutasyonlar sonucu, 1997 yılından itibaren beta laktamaz inhibitörlerine dirençli yeni varyantların oluştuğu belirlenmiştir. Bu enzimler IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV'de sıralamaya girmiştir.

2.4.3.2. SHV'den köken alan GSBL'ler

SHV grubu enzimlerin köken aldığı SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae* 'da bulunmaktadır ve sıklıkla kromozomal bir enzimdir. SHV kökenli GSBL'lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha azdır, ayrıca aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda karakteristik değişiklik, 238. pozisyonda

glisin yerine serin girmesidir (37). Bugüne kadar aminosit yer değiştirmelerinin benzersiz kombinasyonları baz alınarak 50'den fazla SHV tanımlanmıştır. SHV-1 aminositlerinin %68'i TEM-1 ile ortaktır. Avrupa ve Amerika'da SHV tip GSBL'lerin hakim olduğu bildirilmektedir. SHV-5 ve SHV-12 bu grubun içinde en yaygın görülenleridir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır, oksiiimino sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (30, 38).

2.4.3.3. OXA'dan köken alan GSBL'ler

Oxasilini hidrolize edebilmelerinden dolayı bu ismi alırlar. OXA grubu enzimler genellikle *P.aeruginosa*'da bulunan GSBL'lerdir. Bu enzimleri taşıyan *Pseudomonas*'ların en önemli özelliği seftazidime yüksek direnç göstermeleridir. Fakat OXA-17 taşıyan suşlar seftazidimden daha fazla sefotaksim ve sefepime karşı direnç gösterir. OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir ve substrat oksasilin ve kloksasilindir. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (30, 37, 39). Aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (33). Birçok OXA tipi GSBL'ler klavulanik asit tarafından inhibisyona oldukça dirençlidir.

2.4.3.4. CTX-M

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni katılan bir gruptur. Bu enzimler TEM ve ailelerine üye olmayan en yaygın gruptur. Sefotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmelerinden dolayı CTX-M olarak adlandırılmıştır. Bazıları ise, seftazidimi sefotaksimden daha hızlı hidroliz ederler. Sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri aminoasit değişiklikleri sonucu değil, büyük olasılıkla enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki yapısal değişiklikler sonucudur. Bu enzimlerin önemli diğer bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır. İlk CTX-M beta laktamaz enzimi 1989 yılında Almanya'dan *E.coli*'de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır (30, 37, 40). Günümüzde CTX-M ailesinde 40'tan fazla enzim bulunmaktadır ve bunlar aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre beş gruba ayrılmıştır. CTX-M-14, CTX-M-

3 ve CTX-M-2 en yaygın olan enzimlerdir. Yayılımları hem plazmidlere hem de hareketli genetik elementlere (ISEcp1 gibi) bağlıdır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmalar çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (41).

2.4.3.5. Diğer sınıfA GSBL'ler

Diğer Sınıf A GSBL'ler yaygın değildir. Esas olarak *P.aeruginosa*'da ve nadir coğrafik bölgelerden rapor edilmiştir. Bunlardan PER-1 enzimi ülkemizde ilk kez *S.typhimurium* daha sonra *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında gösterilmiştir. Plazmid kontrolünde bir enzim olan PER-1 enzimi içeren *P.aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidime çok dirençli olmalarına karşın piperasilin için daha düşük bir direnç göstermeleridir. Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır.

2.4.3.6. İnhibitör dirençli geniş spektrumlu beta laktamazlar

Beta laktamaz inhibitörlerine (amoksisilin-klavulanik asit) dirençli *E.coli*' ler 1997 yılından itibaren bildirilmeye başlamıştır. Nükleotid dizilerinin incelenmesiyle TEM beta laktamazlardaki mutasyonlar sonucu GSBL'lerde olduğu gibi yeni beta laktamaz inhibitörlerine dirençli varyantların (IRT BL) oluştuğu belirlenmiştir. TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT' ler 3. kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir. Bu enzimler önceleri IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV' de sıralamaya girmiştir. IRT'ler en sık olarak *E.coli*'de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir. İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulanik asit ve sulbaktam ve bunların klinik kullanımda olan kombinasyonlarına dirençli, tazobaktam ve piperasilin-tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdır (30).

2.4.4. Güncel önem taşıyan beta laktamaz grupları

2.4.4.1. Bush Grup 1 kromozomal enzimler (AmpC beta-laktamazlar)

1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilen bu enzimler gram negatif basillerin çoğu tarafından üretilmektedir (42). Sefepim, bu enzimlerin etkilerine göreceli olarak dayanıklıdır. Karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine yol açabilmektedir. Bu enzimler, aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sulfonların beta laktam halkalarına bağlanamadıkları için beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler. Grup 1 enzimlerin çoğu indüklenebilir niteliktedir. *E.coli*'de AmpR bulunmadığı için bu türde indüklenebilir kromozomal enzimler görülmez.

2.4.4.2. Plazmid kökenli AmpC tipi beta laktamazlar

Plazmid kökenli aktarılabılır AmpC tipi beta; laktamazlar, kromozomal AmpC betalaktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile gelişip; *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Salmonella spp.* *C.freundii*, *E.aerogenes*, *P.mirabilis* suşlarında bulunabilmektedir. Plazmid kökenli AmpC tipi enzimler indüklenebilir olmamaları ile diğer enzimlerden ayrılırlar. Bu enzimler geniş spektrumlarının yanı sıra aktarılabılır olanları ile sorun oluşturmaktadır. Özellikle AmpC tipi enzimin aşırı üretimi dış membran porin kaybı veya bir diğer beta laktamazın sentezi gibi ek bir mekanizma ile birleştiğinde enzimlerin etki spektrumları çok genişlemektedir. Örneğin, plazmid kökenli ACT-1 beta laktamazını üreten *K.pneumoniae* suşlarında 42 kDa'lık bir dış membran protein kaybı, imipenem direncine yol açmaktadır. Sonuç olarak, AmpC tipi enzimlerin enterik bakteriler arasında yayılıyor olması tedavi seçeneklerinin daralmasına neden olduğundan sorun oluşturmaktadır. Bu tip bakterilerin seleksiyonu açısından en düşük riski sefepimin taşıdığı öne sürülmektedir, fakat bu ilaçlarla yapılan tedavi sırasında porin kaybı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bu sefamisin grubu antibiyotiklerin ülkemizde satışı yapılmamaktadır. *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında, 3.kuşak sefalosporinlerin yanısıra sefoksitine ve beta laktamaz inhibitörlerine direnç bulunması, AmpC tipi bir enzimin varlığını düşündürmelidir (43, 44).

2.4.5. GSBL'lerin epidemiyolojisi

GSBL üreten organizmaların sayısı tüm dünyada hızla artmaktadır. GSBL prevalansının ülkeler, şehirler, hastaneler arasında değiştiği; hatta aynı hastanedeki servisler arasında dahi farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (7). Yapılan çalışmalarda *Klebsiella* izolatlarında GSBL oranı Latin Amerika'da %42.7, Avrupa'da %21.7, Kuzey Amerika'da %5.8 olarak bildirilmiştir (8). Tonkic ve ark. (45) yaptıkları çalışmada *K.pneumoniae*'de GSBL oranını %36.8 olarak bulmuşlardır. Son yıllarda ülkemizde *Klebsiella spp.* izolatlarında %42-56.5 arasında değişen oranlarda GSBL pozitifliği tespit edilmiştir (9, 10).

TEM ve SHV tipi enzimler 90'lı yıllarda en sık gözlenen GSBL enzimleri olup özellikle *K.pneumoniae*'de sık görülmekteydi (46). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise CTX-M enzimlerinin daha yaygın hale geldiği ve özellikle toplum kökenli *E. Coli* türlerinde bu enzimlerin sık görüldüğü bildirilmiştir (46, 47). CTX-M-3, SHV-2 ve SHV-5 Doğu Avrupa ülkelerinde hızla yayılmaktadır (48). Ülkemizde ise en sık CTX-M-15 görülürken (49), OXA-48 karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatlarının ve SHV-12 enziminin de sıklığının arttığı bildirilmektedir (50).

Gerek ülkemizde gerekse yurtdışındaki GSBL oranlarında görülen farklılıklar, bakterilerdeki enzim üretim sıklığının belli şartlarla değişiyor olması ile ilgilidir (51). Enzim üretimindeki artışın geniş spektrumlu beta laktam antibiyotik kullanımıyla yakın ilişkili ve beta laktam direncindeki artışla paralel olduğu bilinmektedir (52).

2.4.6. GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunlar

a) Direnç: Bu enzimleri taşıyan plazmidler aynı zamanda pek çok beta laktam dışı antibiyotiğe karşı genetik materyal taşıdığından GSBL üreten bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci de eş zamanlı bulunabilmektedir (53).

b) GSBL üreten organizmalar ile kolonizasyon veya enfeksiyon gelişimi için risk faktörleri

- Hastanede kalış süresi,
- YBÜ kalış süresi,
- Uzun süreli antibiyotik kullanımı,
- Santral venöz veya arteriyel kateter varlığı,
- Acil abdominal cerrahi,
- Bir gastrostomi veya jejunostomi tüpü varlığı,
- Düşük doğum ağırlığı,
- Önceden ikamet edilmiş uzun süreli bakım tesisi (örneğin: huzurevi),
- Hastalık şiddeti,
- Bir üriner kateterin varlığı,
- Solunum destek ünitesi,
- Hemodiyaliz vb.

c) Enfeksiyonların tedavisinde zorluk: Bu bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda çoklu direnç gelişimi sık görüldüğünden tedavi seçenekleri çok kısıtlanmaktadır.

d) Morbidite ve mortalite: Pek çok retrospektif çalışmada GSBL varlığının mortalite ve morbiditeyi olumsuz etkilediği gösterilmiştir (53).

e) Laboratuvarında GSBL saptanmasında karşılaşılan zorluklar: GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokülüm etkisi gibi nedenlerle 3.kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görünebilir. Örneğin TEM-26 taşıyan *K.pneumoniae* suşu in vitro seftazidime dirençli, sefotaksime duyarlı gibi görünebilir. TEM-26 düşük yoğunluklarda bile seftazidime yüksek afinite gösterir, buna karşın sefotaksime hidrolitik aktivite enfeksiyon ortamında olduğu üzere bakteri yoğunluğunun arttığı durumda ortaya çıkar. Bu nedenle sefotaksimle tedavi başarısızlıkla sonuçlanır. Seftazidime yüksek afinite gösteren GSBL'lerin sık rastlandığı bir yerde laboratuvarın rutin duyarlılık testlerinde 3.kuşak sefalosporinlerden sefotaksim ve seftriaksonu tercih etmesi GSBL saptanmasını güçleştirecektir.

2.4.7. GSBL'lerin laboratuvar tanısı

2.4.7.1. GSBL tarama testleri

3.kuşak sefalosporinlere karşı direncin seviyesi farklı GSBL enzimleri arasında çok fazla değişkenlik göstermektedir. GSBL'yi araştırmanın en iyi yolu, başlangıçta sefpodoksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim veya aztreonama azalmış hassasiyetin araştırılmasıdır. Sayılan beş antibiyotikten iki tanesinin kullanılması önerilmektedir ancak değişik GSBL'lerin substrat tercihleri farklı olduğundan duyarlılık testlerinde farklı geniş spektrumlu beta laktamların bulunması tarama testinin duyarlılığını artırmaktadır (25). GSBL tarama testinde antibiyotik zon çapları minimum inhibitör konsantrasyonları tablo 3'de sunulmuştur (54).

Tablo-3: GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri (NCCLS)

Antibiyotik	İnhibisyon zonu(mm)	MİK(µg/ml)
Sefotaksim	≤27	≥2
Seftriakson	≤25	≥2
Seftazidim	≤22	≥2
Sefpodoksim	≤17	≥2
Aztreonam	≤27	≥2

Amerika'nın Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerilerine göre; Cefoksitin duyarlı ve Ceftazidim zon çapı 22 mm ve altındaysa, Aztreonam ve Sefotaksim zon çapı 27 mm ve altındaysa, Ceftriakson zon çapı 25 mm ve altındaysa, Cefpodoksim zon çapı 17 mm ve altındaysa; kesinlikle GSBL için doğrulama testi yapılmalıdır.

2.4.7.2. GSBL doğrulama testleri

Fenotipik doğrulama testleri klavulonik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler, GSBL'leri beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen Amp-C tipi enzimlerden ayırt etmektedir.

GSBL doğrulama testleri:

- Çift Disk Sinerji (ÇDS) Testi
- Kombine Disk Yöntemi
- Üç boyutlu test
- Klavulanik asit kombinasyonlu mikrodilüsyon testi
- Klavulanik asit kombinasyonlu disk difüzyon testi
- E-test yöntemi
- Otomatize sistemler (Vitek, MicroScan, BD Phoenix)
- Moleküler teknikler (PCR, DNA probları, Nükleotid sekanslama)

2.4.7.2.1. Çift disk sinerji testi

Bu disk difüzyon yönteminde bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanır ve Mueller Hinton agar plağına yayılır. Plağın merkezine amoksisilin-klavulonik asit diski (AMC 10/20µg) yerleştirilir. Merkeze uzaklığı 20– 25 mm olacak şekilde aztreonam (AZT 30µg), seftazidim (CAZ 30µg), sefotaksim (CTX 30µg), seftriakson (CRO 30µg) veya sefpodoksim (CPO 10µg) diskleri konulur. Plak, 35°C'de 18–20 saat inkübe edilir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik aside doğru genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasında bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bölge görülmesi GSBL pozitif (+) olarak yorumlanır (15).

Kromozomal ve indüklenebilir Amp-C enzimi üreten türlerde, doğrulama testleri ile ilgili güçlükler bulunmaktadır (55, 56). Klavulonik asit Amp-C tipi beta laktamazları indüklediği için, klavulonik asit yanındaki beta laktamazın etkinliğini arttırmak yerine azaltmaktadır. Bu durumda GSBL varlığına bağımlı sinerji ortadan kalkmaktadır. Sulbaktam ve tazobaktam gibi sülfonlarla indüksiyon olmadığı için, Amp-C üreten türlerde klavulonik asit yerine bu ajanlar kullanılabilir. Sefepim, üçüncü kuşak sefalosporinlere kıyasla Amp-C tipi beta laktamazlardan minimal düzeyde etkilendiği için bu tip enzimleri üreten suşlarda GSBL saptanmasında daha güvenlidir. Yine Amp-C tipi beta laktamaz üreten suşlarda sefoksitine direnç görülmesi GSBL ayırımında kullanılabilir bir parametredir (56).

Bu yöntemin duyarlılığı %79-97, özgüllüğü ise %94-100'dür. Kolay, rutin ve ucuz olması avantajlarıdır. Dezavantajı ise, izolatın ürettiği enzim miktarına veya tipine göre

diskler arası uzaklığın standardizasyonunun olmamasıdır ve yorumu subjektiftir. SHV-2 taşıyan izolatlarda yanlış negatif sonuç vermektedir.

2.4.7.2.2. Kombine disk yöntemi

Kombine disk yönteminde sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerine 10µg klavulanik asit eklenir. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (15). (Ör.: seftazidim zon çapı=16 mm, seftazidim klavulonik asit zon çapı= 21 mm).

2.4.7.2.3. Üç boyutlu test

Bakterilerin kanlı agar besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonları Triptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek 35°C'de 4 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözdürülerek enzim ekstraksiyonu yapılır. Standart disk difüzyon testi için Mueller Hinton agara ATCC 25922 *E. coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılır ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µL elde edilen enzimlerden konulur. Petriler 35 °C'lik etüvde bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan 3 mm'ye eşit ve 3 mm'den fazla distorsiyona neden olanlar "üç boyutlu test pozitif" olarak kabul edilir (57).

2.4.7.2.4. Dilüsyon yöntemleri

Sıvı mikrodilüsyonda, sefotaksim ve seftazidim tek başlarına ve 4 µg/ml klavulanik asit ile birlikte test edilir. Klavulanik asit ile kombine edilen ilacın MİK değeri tek başına olanla kıyaslandığında ≥ 8 kat azalma GSBL varlığını gösterir (15).

2.4.7.2.5. E Test yöntemi

Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim klavulonik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Benzer şekilde sefotaksim (CT) ve sefotaksim

klavulonik asit (CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK degerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulanik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (15).

Bu yöntemin duyarlılığı %87-100, özgüllüğü ise %95-100'dür (46, 58). Enzimatik aktivitesi düşük olan GSBL'leri saptamada güçlük bulunması ve maliyetinin yüksek olması rutin kullanımını kısıtlamaktadır.

2.4.7.2.6. Otomatize sistemler

Otomatize sistemler, bazı spektrofotometrik ve / veya başka bir dizi ölçüm yöntemi kullanılarak mikroorganizmaları tiplendiren bir yöntemdir. Bazı sistemlerde, ayrıca ilaç dirençlilik profillerini görüntülemek için kullanılan sistemlerdir. Genel olarak, tiplendirilmek istenen mikroorganizmanın kolonilerinden belirli bir bulanıklıktaki (genellikle 0,5 Mc Farland) bakteri süspansiyonu sistem ile birlikte sağlanan kartuşlar üzerindeki belirli bölgelere uygulanmaktadır. Belirli bir ısıdaki inkübasyonun ardından, cihaz üzerine yerleştirilen kartuşların okunması ve sonuçların alınması ile tiplendirilme yapılmaktadır.

Bakteriyolojide kullanılan VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test gibi otomatize sistemler de GSBL üreten suşları saptayabilmektedirler. Bu sistemler; GSBL varlığını çeşitli kuralları işleterek tüm penisilinleri, sefalosporinleri ve aztreonamı dirençli olarak rapor ederler. Bu sistemlerin özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarındaki direnci saptamakta yetersiz olduğu bildirilmektedir (59).

2.4.7.2.7. Moleküler yöntemler

Spesifik GSBL tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gerek vardır. GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın belirlenmesi var olan GSBL'leri göstermek için yeterli olmaktadır. İzoelektrik odaklama yöntemi ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenerek hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (60). Ancak sayıları

150'nin üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan enzim tiplerinin sadece izoelektrik noktalara dayanarak belirlenmesi artık mümkün görünmemektedir.

Günümüzde özgül enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. En sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntem beta laktamaz genlerine spesifik oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı PCR'dır. Bu yöntemle ancak enzimin bağlı olduğu aile saptanabilir, enzim varyantları arasında ayırım yapılamaz (61). Bu amaçla geliştirilen oligotyping yöntemi ile TEM-1, TEM-2 ayırımı yapılabilir (62). Oligotyping metodunda nokta mutasyonları saptayabilen probalar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sekans spesifik peptid nükleik asit (PNA)-bazlı multipleks PCR yönteminin *bla*-GES-2 identifikasyonunda standart PCR ve sekans yöntemlerine oranla daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (63).

Enzim genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen DNA dizi analizi yöntemi ise halen altın standart olma özelliğini korumakla birlikte, maliyeti yüksek ve emek gerektiren bir yöntemdir.

2.4.7.2.8. Hızlı tanı yöntemleri

GSBL üreten bakteriler için HMRZ-86 kromojenik substratının kullanıldığı bazı yöntemler bildirilmiştir. Bu kromojenik substratın kan kültürlerine eklenmesi ile GSBL üreten bakterilerin 15 dakika - 2 saat (sıvı besiyerine pasaj yapıldığında) içinde saptanması mümkün olmaktadır (64). Bu substratın kullanıldığı Cica Beta Test (Kanto Chem, Japonya; Mast İngiltere) ile 2-15 dakikada GSBL, AmpC ve metallo beta laktamaz üretimi saptanabilmektedir.

Yine sefpodoksim içerdiği için GSBL üreten bakterileri seçmenin yanı sıra *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* ve *Protease* grubu bakterilerin ayırımını yapabilen ChromID ESBL (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) hızlı tanı sağlayan ticari kromojenik bir besiyeridir (65). Bir başka kromojenik besiyeri olan CHROM Agar CTX'in ise, AmpC üreten izolatlarda bile CTX-M pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerini saptayabildiği bildirilmiştir (66).

Klinik izolatlarda GSBL varlığını saptama amacıyla kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo-4: GSBL varlığını saptamak için kullanılan yöntemlerin üstünlüklerinin karşılaştırılması

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
CLSI GSBL tarama testleri	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir.
Çift disk sinerji	Uygulama ve yorum kolaylığı	Diskler arası mesafeler halen standart değil.
Üç boyutlu test	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL'ye özgül değildir.
E test	Uygulama kolaylığı	maliyet yüksek.
Otomatize sistemler	Uygulama kolaylığı	Karbapenem dirençli <i>K.pneumoniae</i> suşlarındaki direnci saptamada düşük duyarlılık
İzoelektrik odaklama	Enzim gruplarını sınıflandırarak PCR testine öncül olma özelliğindedir.	Uygulama zor, benzer izoelektrik noktalı enzimleri ayırt etmede yetersiz
PCR	Kolay uygulama, gen ailesine spesifik	TEM ve SHV varyantları arasında ayırım yapmada yetersiz.
Oligotiplendirme	Özgül TEM varyantları saptanabilir.	Yeni varyantlar tespit edilememekte
PCR-RFLP	Uygulama kolay, spesifik nükleotid değişiklikleri saptanabilir.	Spesifik nükleotid değişiminin saptanmalıdır.
Nükleotid dizi analizi	Altın standart. Yeni enzimler saptanabilir.	Uygulama zor, maliyet yüksek

2.4.8. GSBL sentezleyen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi

4.kuşak sefalosporin olan sefepim özellikle SHV kökenli GSBL'lere karşı etkilidir. Fakat bu antibiyotik artan beta- laktamaz yoğunluğu karşısında inokulum etkisine maruz kalıp inaktive edilmektedir. Ayrıca sefepim kullanımındaki artış GSBL üreten bakterilerle salgına neden olabilmektedir. Kullanılacaksa yüksek dozlarda ve mümkünse etkili olabilecek diğer antibiyotiklerle (kinolon ya da aminoglikozidler) birlikte kullanılması önerilmektedir. Bazı

mikroorganizmalar birden çok beta laktamızı birlikte sentezleyerek veya aynı beta laktamızı yüksek miktarlarda üreterek beta laktamaz inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine neden olabilir. Günümüzde GSBL üreten gram negatif bakterilerin tedavisinde en fazla tercih edilen antibiyotiklerin başında karbapenem türevleri gelmektedir. Karbapenem türevleri hem plazmid hem kromozom aracılığıyla sentezlenen beta laktamazlara etkilidir (1, 3).

2.4.9. GSBL üreten bakteri infeksiyonlarının önlenmesi

İzolasyon önlemleri, çevresel dekontaminasyon ve antibiyotik kullanım paternlerinde değişiklik gibi enfeksiyon kontrol önlemleri sayılabilir. Pek çok çalışmada hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımı kısıtlanmasının GSBL üreten bakteri infeksiyonlarında azalmaya ve salgınların kontrol altına alınmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımı kısıtlanarak yerine karbapenem veya piperasilin-tazobaktam kullanımının sağlanmasının özellikle GSBL üreten *K.pneumoniae* infeksiyonlarının önlenmesi açısından etkili olduğu gösterilmiştir (1, 3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2014 Haziran 2015 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *Klebsiella spp.* suşu, tür tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması sonucunda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının saptanması için değerlendirmeye alındı. Hastaların aynı dönemde birden fazla kültür örneklerinden izole edilen *Klebsiella spp.* izolatlarından yalnızca bir tanesi çalışmaya dahil edildi. Aynı hastaya ait tekrarlayan örnekler çalışma kapsamı dışında tutuldu.

İzole edilen *Klebsiella* suşlarının disk diffüzyon yöntemiyle Amoksisilin-Klavulanat (AMC), İmipenem (IMP), Piperasilin-Tazobaktam (TZP), Sefepim (FEP), Amikasin (AK), Siprofloksasin (CIP), Gentamisin (CN), Sefotaksim (CTX), Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Sefoksitin (FOX), Trimetoprim/Sulfametaksazol (SXT), Aztreonam (ATM) duyarlılıkları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. January 2014) yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi. GSBL varlığının tespiti için ÇDST ve E Test yöntemleri kullanıldı.

Hastaların yaşı, cinsiyeti, numune tipi, yattığı klinik, *Klebsiella* enfeksiyonu için risk faktörleri gibi bazı epidemiyolojik bilgileri kaydedildi.

3.1. Kullanılan besiyerleri ve diğer malzemeler

3.1.1. Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere)

İçeriği (g / l)

Spesifik Pepton10.0

Liver digest2.5

Yeast extract5

Sodium chloride5

Agar10

pH 7.3±0.2

Kanlı agar, genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

1000 ml distile su içerisinde 40.0 gram kanlı agar besiyeri eklendi. 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı. Besiyeri prosedüre uygun olarak hazırlandıktan sonra pH 7.3'e ayarlandı. 121°C' de 15 dakika steril edildi. Besiyeri 45-50°C' ye soğutulduktan sonra yoğunluğu %7 olacak şekilde defibrine insan kanı eklendi. Karıştırılarak homojenizasyon sağlandıktan sonra 8 cm çapındaki steril petri kutularına döküldü. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

3.1.2. Eozin metilen blue agar (Oxoid, İngiltere)

İçeriği (g/ l)

Pepton	10.0
Laktoz	10.0
Dipotassium hidrojen fosfat	2.0
Eosin Y	0.4
Metilen blue	0.06
Agar	15.0
pH 7.2±0.2	

Eozin Metilen Blue Agar (EMB), Gram negatif bakterilerin üremesinin sağlanması ve üreyen bakterilerin laktozu fermente etme özelliğinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

1000 ml distile su içerisinde 37.5 gram EMB agar besiyeri eklendi. 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı. Besiyeri prosedüre uygun olarak hazırlandıktan sonra, pH 7.2'e ayarlandı. 121°C' de 15 dakika steril edildi. Besiyeri 45-50°C'ye soğutulduktan sonra, 8 cm çapındaki steril petri kutularına döküldü. Kullanılincaya kadar +4°C' de saklandı.

3.1.3. Mueller hinton agar (Oxoid, İngiltere)

İçeriği (g/ l)

Dehydrate infusion	300.0
Casein hidrolisate-asidic	17.5
Agar	17.0
Starch	1.5
Heart extract paste	5

Mueller Hinton Agar (MHA), antibiyotik duyarlılık testleri için kullanıldı.

MHA besiyeri, ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi. Steril plaklara 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Kullanılincaya kadar + 4 °C’de muhafaza edildi.

3.1.4. Triple sugar iron agar (Acumedia, USA)

İçeriği (g/ l)

Kazein	5
Enzymatic digest of animal tissue... ..	5
Pepton	10
Dextroz	1
Laktoz	10
Sukroz	10
Ferrik amonium sitrat	0.2
Sodyum Klorür	5
Sodyum Tiosülfat	0.3
Fenol Red	0.025
Agar	13.5

pH: 7.3 ± 0.2

Triple Sugar Iron (TSI) Agar, bakterilerin glukoz, laktoz ve sükroz şekerlerini fermente etme, gaz ve H₂S oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

Temel besiyeri tartıldı, distile su içinde benmaride hafif ısıtılarak eritildi. pH 7.4’e ayarlandı. Tüplere 5’er ml dağıtılıp; ağızları pamuk tıkaç ile kapatıldı. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi. Tüpler yatık durumda, yüzeyi eğimli olacak şekilde katılaştırıldı. Kullanılincaya kadar +4°C’ de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı: Tek koloniden iğne öze ile tüp tabanına 0.5 mm kalacak şekilde batırma ekimi yapıldı, koloni aynı zamanda yatık yüzeye de ekildi. 37 °C’lik etüvde 24 saat inkübe edildi.

3.1.5. Simmon's sitrat agar (Biolife, İtalya)

İçeriği (g/ l)

Mononamonyum fosfat	0.2
Sodyum Klorid	5.0
Sodyum sitrat tribasic	2.0
Magnesium sulfat	0.2
Brom timol mavisi	0.08
Agar	15
Sodyum amonium fosfat	0.8

Simmon's Sitrat Agar, bakterilerin karbon ve enerji kaynağı olarak sitrati kullanma özelliklerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

Ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı. pH: 6.9'a ayarlandı. Tüplere 5'er ml dağıtılıp; ağızları pamuk tıkaç ile kapatıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Tüpler yatık durumda, yüzeyi eğimli olacak şekilde katılaştırıldı. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı: Tek koloniden iğne öze ile besiyeri yüzeyine ekim yapıldı. 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi.

3.1.6. SİM medium (HİMEDİA, Mumbai, Hindistan)

İçeriği (g/ l)

Sığır ekstraktı	3.000
Peptic digest of animal tissue.....	30.000
Peptonized iron	0.200
Sodium thiosulphate	0.025
Agar	3.000
pH (25°C) 7.3 ± 0.2	

Hidrojen sülfür üretiminin belirlenmesi, indol oluşumu ve enterik hareketlilik açısından kullanıldı.

Temel besiyeri tartıldı, distile su içinde benmaride hafif ısıtılarak eritildi. pH: 7.4'e ayarlandı. Tüplere 5'er ml dağıtılıp; ağızları pamuk tıkaç ile kapatıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Tüpler dik konumda soğumaya bırakıldı. Kullanılıncaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı: Tek koloniden iğne öze ile tüp tabanına 0.5 mm kalacak şekilde batırma ekimi yapıldı. 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi.

3.1.7. Christensen üre agar (MERCK, Germany)

İçeriği (g/ l)

Gelatine peptone	1.0
D(+)-Glucose	1.0
Potassium dihydrogen phosphate	2.0
Sodium chloride.....	5.0
Phenol red.....	0.012
Agar.....	12.0
pH 6.8 +/- 0.2 (at 25 °C)	

Üre Agar üreaz üretimini tespit etmek için kullanıldı. Üreaz enzimi üreyi parçalar ve amonyak açığa çıkar. Ortam alkali olur.

Temel besiyeri tartıldı, distile su ilave edildi ve çalkalanarak eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50 °C'ye soğutulduktan sonra % 40 üre solüsyonu ilave edilip karıştırıldı. Steril tüplere 5'er ml dağıtıldı; ağızları pamuk tıkaç ile kapatıldı. Tüpler yatık durumda, yüzeyi eğimli olacak şekilde katılaştırıldı. Kullanılıncaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

Testin Yapılışı: Tek koloniden iğne öze ile besiyeri yüzeyine ekim yapıldı. 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi.

3.1.8. Kullanılan antibiyotikler

a. Disk diffüzyon testinde kullanılan antibiyotikler (Oxoid, İngiltere)

- Amikasin (30 µg)
- Piperasilin / tazobaktam (100 µg /10 µg)
- İmipenem (10 µg)
- Trimetoprim / sulfametaksazol (10 µg)
- Siprofloksasin (5 µg)
- Gentamisin (120 µg)
- Sefoksitin (30 µg)

b. Çift Disk sinerji testinde kullanılan antibiyotikler (Oxoid, İngiltere)

- Amoksisilin/klavulanik asit (20 µg /10 µg)
- Aztreonam (30 µg)
- Seftriakson (30 µg)
- Seftazidim (30 µg)
- Sefotaksim (30 µg)
- Sefepim (30 µg)

c. E Testte kullanılan antibiyotikler (Bioanalyse, Türkiye)

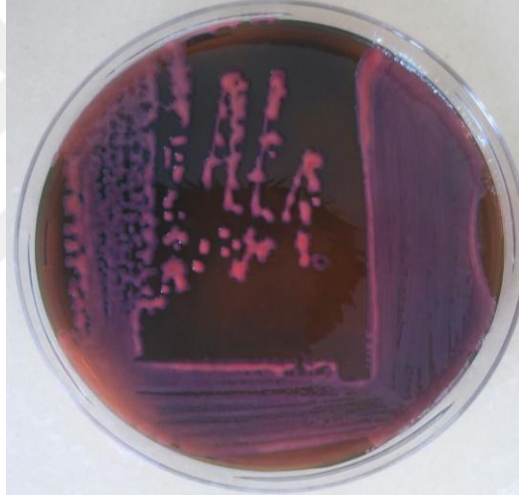
- Seftazidim (30 µg/ml) – seftazidim / klavulanik asit (30/10 µg)

3.1.9. Kullanılan diğer gereçler

- Kan kültür cihazı (Becton Dickinson, USA)
- Etüv (Memmert, LODING 100-800, Macherey Nagel)
- McFarland cihazı (Densichek bioMérieux, Fransa)
- 2 ml.'lik steril tek kullanımlık kapaklı endorff tüpleri
- Cam mezür
- Otoklav
- pH metre
- İğne öze

3.2. Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

Kültürü yapılmak üzere laboratuvara gönderilen çeşitli klinik örnekler, kanlı agar , çikolatamsı agar ve eosin methylene blue (EMB) agar besiyerlerine ekildi. 37°C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında bakterilerin saf kültürleri elde edildi. Kolonilerin koloni morfolojileri ve koloni sayıları incelendi. Laktoz pozitif mukoid koloniler şüpheli kabul edildi. İdrar kültürlerinde koloni sayısı 5×10^4 'den fazla olan örnekler değerlendirmeye alındı. Bu mikroorganizmaların gram boyamaları yapıldı. Mikroskop incelemesinde gram (-) basil oldukları görülen suşlara oksidaz deneyi yapıldı. Oksidaz negatif koloniler için ileri tanımlama işlemlerine geçildi.



Resim-1: EMB besiyerinde üreyen *K.pneumoniae*

3.2.1. Biyoşimik testlerle tanımlama

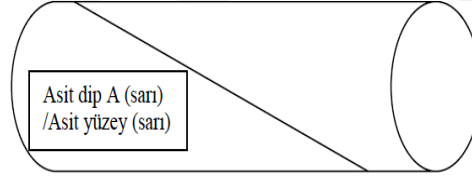
TSI besiyerinde glukoz, laktoz ve sükroz kullanımı ile gaz ve H₂S oluşturması, sitrat besiyerinde sodyum sitrat kullanımı, üre agar besiyerinde üreaz üretimi, SIM besiyerinde indol oluşumu ve enterik hareketlilik yönünden değerlendirildi.

Biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine göre adlandırılan mikroorganizmalar gerektiğinde API 20E (bioMérieux, France) testi yapılarak identifikasyon işlemi tamamlandı.

3.2.1.1. TSI besiyerinin değerlendirilmesi

TSI besiyeri bakterilerin glikoz, laktoz ve sukroz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını belirlemeye yöneliktir. Hafif alkali ortamı olarak hazırlanan TSI besiyeri, içerdigi fenol kırmızısı sayesinde alkali ortamda kırmızı görünümündedir. İnoküle edilen bakteri, TSI ortamında bulunan karbonhidratları fermente ettiği takdirde ortamın pH'sı aside kaymakta ve asit ortamda fenol kırmızısı sarı bir renge dönüşmektedir. Glikozu fermente edip, laktozu ve sukrozu parçalamayan bakteriler dipte sarı, yatık alanda kırmızı renk oluştururlar. Eğer inoküle edilen bakteri karbonhidratlardan hiçbirini kullanmazsa ortamın pH'sı alkali kalmakta yani besiyerinin rengi kırmızı olarak devam etmektedir.

Dip ve yatık kısımdaki renk değişimine göre bakterilerin karbonhidratları fermente edip etmediği değerlendirildi. Ayrıca siyah renk oluşumu bakterilerin H₂S oluşturduğu, besiyerinde hava kabarcıkları veya çatlamaların varlığı ise gaz oluşturduğu yönünde değerlendirildi.



Resim-2: TSI besiyeri

3.2.1.2. Sitrat besiyerinin değerlendirilmesi

Sitrat testinde bakterinin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığına bakılmaktadır. Besiyeri içinde bromtimal mavisi bulunmaktadır. Besiyerinin yeşilden maviye dönmesi bakterinin sitratı kullanması anlamına gelir ve test pozitifdir. Renk değişimi olmazsa test negatifdir. Sitrat testi Klebsiella türleri için pozitifdir.



Resim-3: Sitrat pozitif

3.2.1.3. Christensen üre agar besiyerinin değerlendirilmesi

Üreaz enzimi bulunan enterik basiller, amonyak üretimine bağlı olarak üre içeren besiyerinin pH'sını alkaliye çevirirler ve besiyerinin rengi indikatör (fenol red) sayesinde inkübasyon sonrası sarıdan pembeye değişir. *K.pneumonia*'de üreaz pozitifdir.



Resim-4: Üreaz pozitif

3.2.1.4. SİM (Sülfid – İndol – Motilite) besiyerinin değerlendirilmesi

SİM besi yerinde, inokulasyon hattı boyunca siyah rengin (demir sülfid, FeS) meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Hiçbir değişiklik yoksa negatif olarak kabul edilir.

Triptofanaz enzimi bulunan gram negatif basiller sıvı besiyerinde triptofondan indol oluştururlar. Besi yerinin üzerine Kovaks solüsyonu konduğunda kırmızı rengin oluşumu

indol pozitif, sarı rengin oluşumu indol negatif olarak değerlendirilir. *K.oxytoca* indol pozitif / *K.pneumoniae* indol negatiftir.

Tüp besiyerinde temiz / berrak bir görünüm ve sadece inokülasyon çizgisinde sınırlı üreme görülmesi hareketsizliği, inokülasyon hattından yanlara doğru yayılan üreme hareketi ifade eder. *Klebsiella* türlerinde hareket yoktur.



Resim-5: SIM besiyeri

3.2.2. API 20 E ile tanımlama

API 20 E test sistemi *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilere ait 20 farklı biyokimyasal test içermektedir (Biomerieux, 2014). Biyoşimik testlerle *Klebsiella* olduğu belirlenen suşlara API 20 E test sistemi uygulandı. Uygulama, üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. API 20 E test sistemindeki biyokimyasal reaksiyonlara göre elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar, bilgisayar programında değerlendirildi.

3.2.3. İzole edilen suşların saklanması

a) Suşları saklamak için % 15 gliserol eklenmiş triptik soy broth hazırlanıp 2 ml'lik steril ependorf tüplerine aktarıldı.

b) Kültürde üreyen, *Klebsiella* olarak tanımlanan suşlar hazırlanan broth içine süspansiyon edildi.

c) Suşlar çalışılmaya kadar -80°C'de saklandı.

3.3. Antibiyotik duyarlılığının araştırılması

3.3.1. Disk Diffüzyon Testi

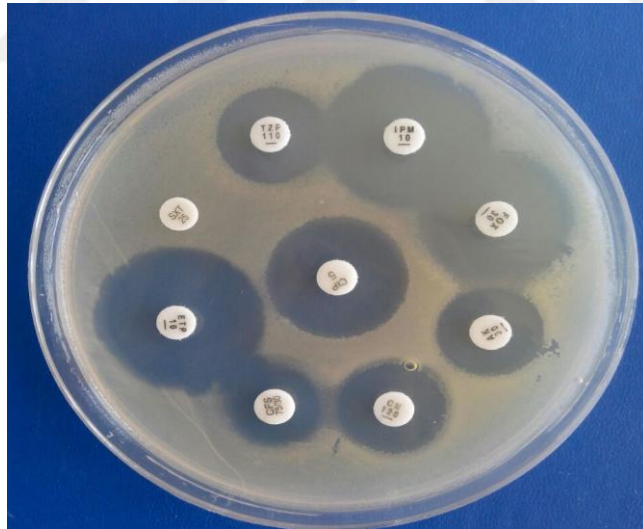
a) İnokulum, kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı.

b) Bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyeri yüzeyine inoküle edildi.

c) Plakların kuruması beklendikten sonra üzerlerine antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler yerleştirildi.

d) 35 C°'de 18-24 saatlik inkübasyonu takiben antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü.

e) CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçlar yorumlandı (58) Tablo 5.



Resim-6: Disk difüzyon testi

Tablo-5: Kirby Bauer disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları

Antibiyotikler	Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapı (mm)		
	Hassas (S)	Orta Dutarlı (I)	Dirençli (R)
Sefepim (FEP)	≥ 19	16 - 18	≤ 15
Trimetoprim / Sulfametoksazol (SXT)	≥ 16	11 – 15	≤ 10
Piperasilin tazobaktam(TZP)	≥ 21	18 – 20	≤ 17
Ciprofloksasin (CİP)	≥ 21	18 – 20	≤ 17
Gentamisin (CN)	≥ 15	13 – 14	≤ 12
Amikasin (AK)	≥ 17	15 – 16	≤ 14
İmipenem (İMP)	≥ 23	20 – 22	≤ 19
Sefotaksim (CTX)	≥ 26	23 – 25	≤ 22
Seftazidim (CAZ)	≥ 21	18 – 20	≤ 17
Seftriakson (CRO)	≥ 24	21 – 23	≤ 20
Aztreonam (ATM)	≥ 26	23 – 25	≤ 22
Amoksisilin / Klavulanikasit (AMC)	≥ 18	14 – 17	≤ 13

3.4. GSBL varlığının araştırılması

3.4.1. Çift disk sinerji testi

a) İnokulum, kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı.

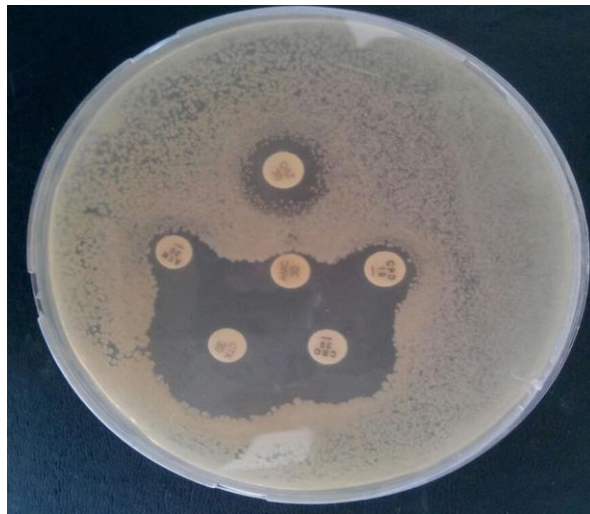
b) Bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla MHA besiyeri yüzeyine inoküle edildi.

c) Ortada amoksisilin-klavulanik asit diski; çevresine sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, aztreonam diskleri merkezden merkeze 25 mm mesafe olacak şekilde yerleştirildi.

d) Hazırlanan plaklar 37 °C'de 18-20 saat süre ile inkübe edildi.

e) İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri incelendiğinde, aztreonam, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefepime ait inhibisyon zonlarının klavulanik asit diski karşısında bozularak genişlemesi, arada hayali bir zon oluşması ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin görülmesi durumunda o suşun GSBL ürettiğine karar verildi.

f) İndüklenebilir AmpC beta laktamaz ayrımının yapılabilmesi amacıyla antibiyotik duyarlılık testine sefoksitin (30 µg) diski eklendi. Sefoksitine dirençli suşların kromozomal AmpC beta laktamaz ürettiği düşünülmüştür.



Resim-7: ÇDST pozitif

3.4.2. E Test

a) İnokülüm, kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı.

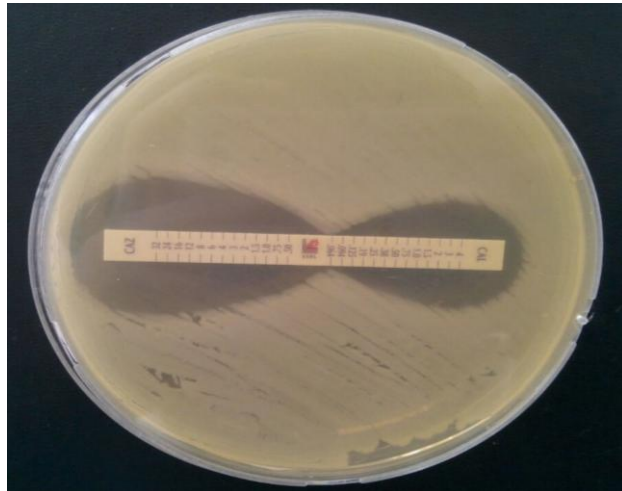
b) Bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla MHA besiyeri yüzeyine inoküle edildi.

c) Bir ucunda seftazidim (CAZ), diğer ucunda seftazidim klavulonik asit (CAL) içeren test stripi plağa yerleştirildi.

d) CAZ ve CAL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması durumunda o suşun GSBL ürettiğine karar verildi.



Resim-8: E Test pozitif



Resim-9: E Test negatif

İstatistiksel analiz: Tüm istatistiksel analizler ‘‘Statistical Package For Social Sciences (SPSS)’’ (versiyon 15.0; SPSS, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalar için, kıkare testi uygulandı. İstatistiksel olarak p değeri 0.05’ den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik bilgiler

Çalışmaya Ocak 2014 - Haziran 2015 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen; biyoşimik testler ve API 20 E testi ile 87'si *K.pneumoinae*, 13'ü *K.oxytoca* olarak tanımlanan toplam 100 suş dahil edildi. *K.pneumoinae* suşlarının 49'unda (%56.3), *K.oxytoca* suşlarının 6'sında (%46.1) GSBL üretimi saptanmıştır. GSBL varlığının soyutlanan *Klebsiella* türlerine göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo-6: GSBL varlığının soyutlanan *Klebsiella* türlerine göre dağılımı

<i>Klebsiella</i> Türü	GSBL Pozitif		GSBL Negatif	
	n	%	n	%
<i>K.pneumoniae</i> (87)	49	56.3	38	43.7
<i>K.oxytoca</i> (13)	6	46.1	7	53.9

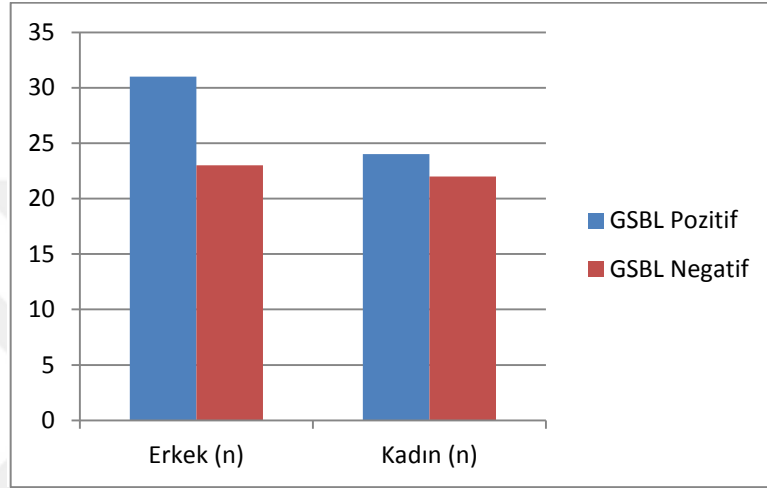
Soyutlanan izolatların klinik örneklere göre dağılımları incelendiğinde 100 suşun: 37'si idrar, 28'i kan, 10'u yara, 8'i trakeal aspirat, 7'si dren ucu, 5'i balgam, 2'si boğaz, 2'si BOS ve 1'i kulak kültüründen elde edildi. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitif 55 suşun 21'i idrar (%38.1), 18'i kan (%32.7), 5'i yara (%9), 4'ü dren ucu (%7.2), 4'ü trakeal aspirat (%7.2), 2'si balgam (%3.6), 1'i boğaz (%1.8) olduğu tespit edildi. İzolatların klinik örneklere göre dağılımları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo-7: GSBL varlığının suşların soyutlandığı klinik örneklere göre dağılımı

Klinik örnekler (n)	GSBL Pozitif		GSBL Negatif		Toplam (n)
	n	%	n	%	
İdrar	21	38.1	16	35.5	37
Kan	18	32.7	10	22.2	28
Yara	5	9	5	11.1	10
Trakeal aspirat	4	7.2	4	8.8	8
Dren ucu	4	7.2	3	6.6	7
Balgam	2	3.6	3	6.6	5
Bos	0	0	2	4.4	2
Boğaz	1	1.8	1	2.2	2
Kulak	0	0	1	2.2	1
Toplam	55		45		100

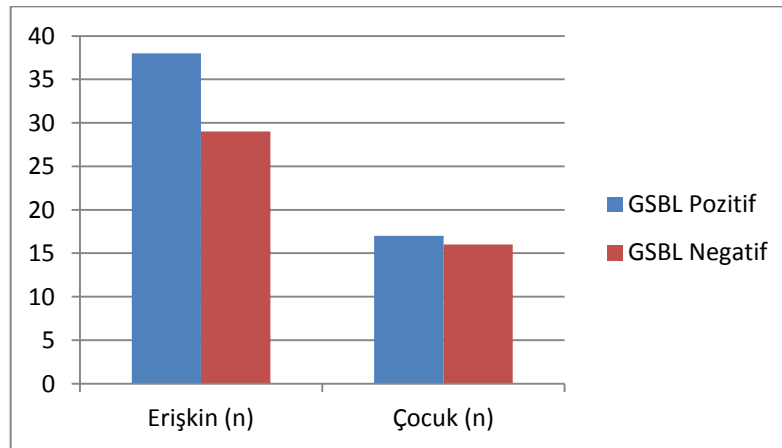
Çalışmaya alınan 100 olgunun 54'ü erkek, 46'sı kadın hasta kültüründen izole edildi. Erkeklerden izole edilen suşların 31'inde (%57.4), kadınlardan izole edilen suşların 24'ünde (%52.1) genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitifliği saptandı. GSBL sıklığı erkeklerde kadınlara göre yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) Şekil 1.

Şekil-1: GSBL varlığının cinsiyetlere göre dağılımı



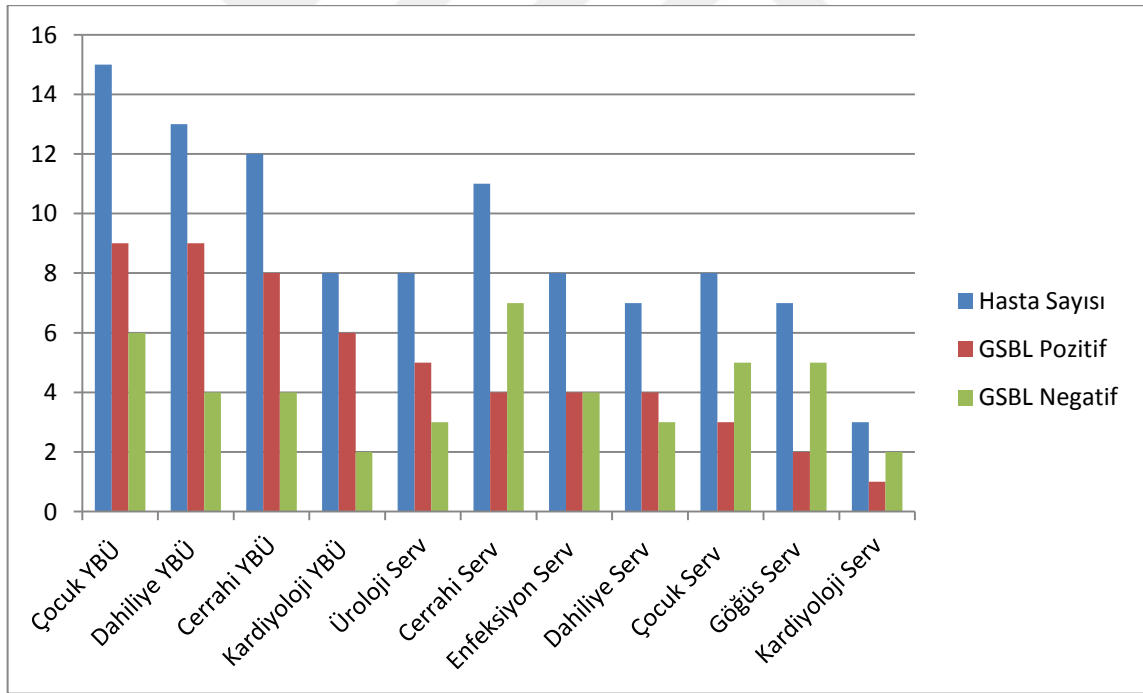
Hastaların 67'si erişkin, 33'ü çocuktur. Erişkin hastalarda GSBL üreten suşların oranı %38, çocuk hastalarda GSBL üreten suşların oranı %17 olarak saptandı. GSBL sıklığı erişkinlerde çocuklara göre yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) Şekil 2.

Şekil-2: GSBL varlığının çocuk ve erişkin yaş grubuna göre dağılımı



Klebsiella olarak soyutlanan 100 suşun 48'i yoğun bakım ünitesi (YBÜ), 52'si çeşitli klinik servislerden (Serv) izole edildi. YBÜ'nden izole edilen suşların 32'si (%66.6), klinik servislerden izole edilen suşların 23'ü (%44.2) GSBL pozitif olarak saptandı. Çalışmaya alınan suşların; 15'i Çocuk YBÜ, 13'ü Dahiliye YBÜ, 12'si Cerrahi YBÜ, 11'i Cerrahi Serv, 8'i Çocuk Serv, 8'i Üroloji Serv, 8'i Enfeksiyon Serv, 8'i Kardiyoloji YBÜ, 7'si Dahiliye Serv, 7'si Göğüs Serv ve 3'ü Kardiyoloji Serv.'inden izole edildi. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitif 55 suşun kliniklere göre oranı; Çocuk YBÜ %16.3, Dahiliye YBÜ %16.3, Cerrahi YBÜ %14.5, Kardiyoloji YBÜ %10.9, Üroloji Serv %9.0, Cerrahi Serv %7.2, Enfeksiyon Serv %7.2, Dahiliye Serv %7.2, Çocuk Serv %5.4, Göğüs Serv %3.6, Kardiyoloji Serv %1.8 olarak bulundu. En fazla GSBL sıklığı Çocuk ve Dahiliye YBÜ'nden tespit edildi. GSBL sıklığı YBÜ'nde servislere göre yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) Şekil 3.

Şekil-3: GSBL varlığının YBÜ ve kliniklere göre dağılımı



4.2. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Laboratuvara gelen örneklerden izole edilen *Klebsiella spp.* suşlarının önce disk diffüzyon testi (DDT) ile 11 değişik antibiyotiğe dirençleri araştırıldı. CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçlar yorumlandı (58). Antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre *Klebsiella spp.* suşlarının %16'sı tüm antibiyotiklere duyarlı iken; en yüksek direnç; %80 oranı ile trimetoprim/sülfometaksazol (SXT)'e karşı görülüp, bunu sırasıyla seftriakson %68 (CRO), sefotaksim %65 (CTX), aztreonam %62 (ATM), seftazidim %52 (CAZ), siprofloksasin %50 (CİP), amoksisilin/klavulanat %35 (AMC), gentamisin %30 (CN), piperasilin/tazobaktam %14 (TZP), amikasin %13 (AK) ve imipenem %1 (IPM) direnci izledi. *Klebsiella spp.* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotik %99 ile IPM'di. *Klebsiella spp.* suşlarının antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik oranları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo-8: *Klebsiella spp.* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (n)	Duyarlı (n)
SXT	80	20
CRO	68	32
CTX	65	35
ATM	62	38
CAZ	52	48
CİP	50	50
AMC	35	65
CN	30	70
TZP	14	86
AK	13	87
IMP	1	99

4.3. GSBL tarama ve doğrulama testlerinin sonuçları

Amerika'nın Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerilerine göre; Cefoksitin duyarlı ve; Ceftazidim zon çapı 22 mm ve altında, Aztreonam ve Sefotaksim zon çapı 27 mm ve altında, Ceftriakson zon çapı 25 mm ve altında olan izolatlar GSBL için şüpheli izolatlar olarak kabul edilip, bu izolatlar için doğrulama testleri yapıldı (58).

Bu çalışmada 100 *Klebsiella spp.* suşunun DDT ile 67'sinde (%67), ÇDST ile 55'inde (%55), E-test stripleri ile 55'inde (%55) GSBL üretimi saptandı Tablo 9.

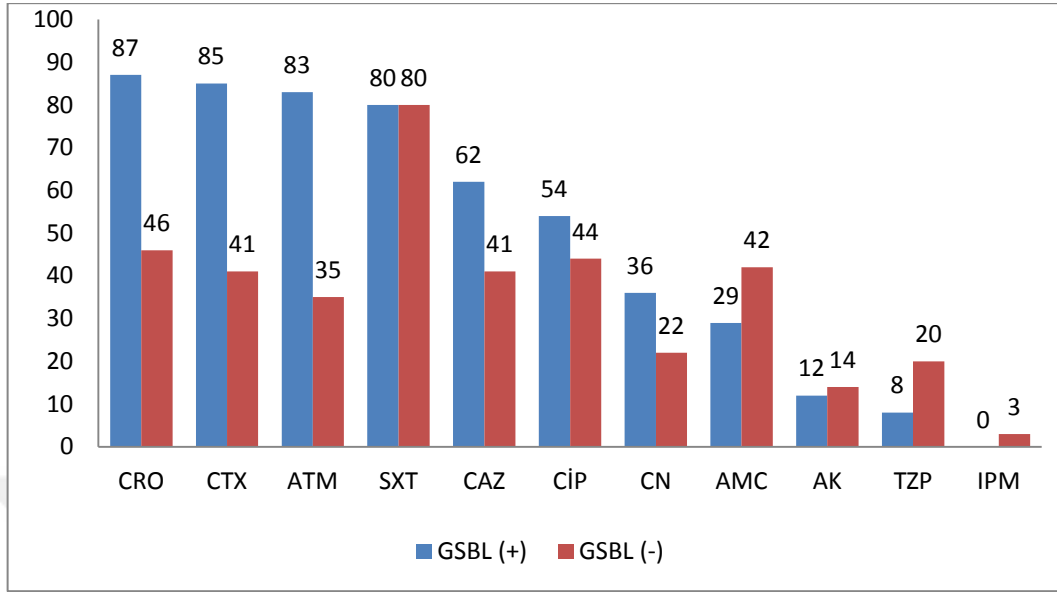
Tablo-9: DDT ile doğrulama testlerinin karşılaştırılması

	ESBL Pozitif	ESBL Negatif	Toplam
DDT	67	33	100
ÇDST	55	45	100
E – TEST	55	45	100

Yaptığımız çalışmada, Disk difüzyon testi ile CRO, CTX, CAZ ve ATM ile “GSBL şüpheli” olarak bulunan örnekler ÇDST referans test kabul edilerek, E- test ile karşılaştırması yapıldı. DDT’inde dört antibiyotik birlikte kullanıldığında 67 suşta GSBL pozitif bulunurken, doğrulayıcı testler olan ÇDST ile 55 ve E-test ile 55 suşta GSBL pozitif bulunması, DDT’nin yalancı pozitifliğe neden olabileceğini düşündürdü.

ÇDST’ne göre GSBL pozitif ve GSBL negatif suşların antibiyotiklere olan direnç durumu araştırıldığında; GSBL pozitif suşlar en fazla CRO (%87), CTX (%85) ve ATM (%83)’a dirençli iken IPM’e direnç gözlenmedi. Bunun yanında, GSBL negatif suşlar ise en fazla SXT (%80)’e, CRO (%46) ve CAZ (%41)’e dirençli iken en az IPM (%3)’e dirençli bulundu Şekil 4.

Şekil-4: Çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif ve negatif örneklerin antibiyotiklere direnç oranları (%)



Çalışmaya alınan hastaların hastanede yatış süresi ortalama 41.97 ± 62.41 gün idi. GSBL pozitif olan hastaların yatış süresi ortalama 43.89 ± 59.46 gün iken, GSBL negatif hastaların yatış süresi ortalama 20.79 ± 34.78 gündü. GSBL için risk faktörü sayılan hastanede yatış süresi, antibiyotik kullanımı, YBÜ’nde yatma, hastada santral venöz kateter ve/veya üriner kateter olması, altta yatan ağır bir hastalığın bulunması GSBL pozitif ve negatif izolatlar karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Günümüzde morbidite, mortalite oranları ile hastane maliyetlerinde artmaya neden olan hastaneden kazanılmış enfeksiyonlar ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (67).

Çalışmamızda *Klebsiella spp.*'lerin en çok izole edildiği kaynak idrar kültürü olmuştur.

Ülkemizde çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalara göre hastane enfeksiyonu (HE) oranı %2.4 - %11.8 olarak saptanırken, HE'ye neden olan gram negatif bakteri %40.8 olarak bildirilmiştir (68). Hacettepe Üniversitesi'nde Köseoğlu ve arkadaşlarının (69) yaptığı bir çalışmada; bakteriyemi olgularında, HE'ye neden olan gram negatif bakteriler arasında en sık *E.coli* (%33) ve *Klebsiella spp.* (%22.1) tesbit edilmiştir.

Günseren F. ve ark'nın (32) çok merkezli çalışmalarında; YBÜ'lerinin HE için beş ile yedi kat risk taşıdığını ve diğer ünitelere göre HE'nin %20-25'nin YBÜ'inde geliştiğini bildirmişlerdir.

Kocazeybek B.S. (70), dört farklı hastanenin YBÜ'ünden izole edilen gram negatif bakterilerden HE etkeni olarak *E.coli* (%31) ve *K.pneumoniae* (%22)'i bulmuştur. Yine aynı çalışmada IPM, AK ve CİP'e duyarlılık açısından GSBL pozitif ile negatif izolatlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamıza alınan *Klebsiella spp.* suşlarının %80 ile en çok SXT'e dirençli olduğu, buna karşın %99 ile de en çok IPM'e duyarlı oldukları saptanmıştır (Tablo 8). Üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç oranları ise CRO %68, CTX %65, CAZ %52 ve ATM için %62'dir.

Çalışmamızda hem GSBL pozitif ve hem negatif izolatların IPM'e duyarlı bulunması, karbapenemlere direncin farklı mekanizmalarla gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. Şener G.ve Yüce A.'nin (71) *K.pneumoniae* suşları üzerinde yaptıkları bir çalışmada %39 oranında GSBL üretimi saptanırken IPM ve meropenem %100 duyarlı bulmuşlardır.

Kocazeybek B.S. ve Arabacı Ü.'nin (72) GSBL'yi belirlemek için E-testini, indüklenebilir beta laktamazı (IBL) belirlemek için ÇDST'ni kullanarak yaptıkları bir

çalışmada, IPM ve MEM'in hassasiyetini %89.7 ve %95.1 bulmuşlardır. İBL üreten suşlarda karbapenem aktivitesi biraz daha düşük bulmuşlardır.

Karbapenemler, trans-6-hidroksietil grubu taşımaları sebebiyle hedefe hızlı penetre olmakta ve PBP'lere yüksek affinite göstermektedirler. İBL'lerde karbapenem direnci, porin D₂'nin mutasyona bağlı kaybı ve kromozomal AmpC tipi enzimin salgılanmasına bağlıdır. Meropenem dış membrandan geçebilmek için porin D₂'yi kullanmadığı için meropeneme direnç imipeneme oranla daha az görülmektedir (73). Bazı çalışmalarda ise antibiyotik kullanımına bağlı GSBL pozitif *K.pneumoniae*'larda OmpK35 ve OmpK36 porinlerinin seleksiyonuna bağlı meropenem ve daha az oranda da IPM'e duyarlılığın azaldığını, plazmide bağlı AmpC beta laktamaz (ACT-1)'in ve SHV-tipi enzimin aşırı üretiminin de katkıda bulunacağı savunulmaktadır (74). Karbapenemler beta laktamaz hidrolizine karşı daha stabil oldukları için tedavide en çok tercih edilmesi gereken antibiyotikler olmalıdır. Bunun yanında karbapenemlerin pahalı olması ve son zamanlarda Japonya'da plazmide bağlı karbapenemazların bildirilmesi, bu ajanların kullanımını da kısıtlayacak gibi görünmektedir (75).

K.pneumoniae, *E.coli*'deki OmpF'nin analogu olarak kabul edilen OmpK35 ve OmpC'nin analogu olarak kabul edilen OmpK36 ile OmpN'nin analogu olarak kabul edilen OmpK37 denilen porin sentezlemektedirler. Bunlardan GSBL pozitif izolatların sadece OmpK36 porini vardır. Bir çalışmada porin eksikliği ile sefoksitin direnci arasındaki ilişki araştırılmış ve GSBL tesbiti için ÇDST kullanılmıştır. Sefoksitin direnci diskler arası uzaklık 2 cm olduğunda saptanmıştır. Sefoksitin dirençli GSBL pozitif izolatlarda OmpK35 eksikliği gözlenmiştir. Ayrıca porin eksikliği ile kinolon, tetrasiklin ve kloramfenikol duyarlılığını da etkilediği bulunmuştur ve siprofloksasin direncinin ancak topoizomerez mutasyonu varlığında görülebileceği anlamlı bulunmuştur. Aminoglikozidlerin duyarlılığı ile porin eksikliği arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (76, 77). CAZ ve diğer oksimino-beta-laktamlara dirençli *K.pneumoniae* K6 referans suşunda yapılan bir çalışmada bu suşun OmpK35 porin kaybına bağlı sefoksitin ve üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç gelişimini ortaya koymuştur. Öncelikle CAZ'ın tercih ettiği bu porinin kaybı CTX'ye oranla CAZ'ın neden daha yüksek MIC değerlerine sahip olmasını açıklamaktadır (78). Birçok araştırmacı GSBL yapan bakterilerin test sonuçlarına bakılmaksızın karbapenemler hariç tüm beta laktamlara dirençli bildirilmesini önermektedir (79).

Yaman A. ve ark. (80) yaptığı bir çalışmada, HE'ye neden olan gram negatif bakteriler arasında en çok *E.coli* (%22) ve *Klebsiella spp.* (%22) izole etmişlerdir. E-test yöntemi ile bu suşlara etkili antibiyotikleri sırasıyla MEM (%89), IPM (%87.2), TZP (%66.4) ve CİP (%64.6) bulmuşlardır.

GSBL'ler tipik olarak 80-300 kb 'lık büyük plazmidlerde kodlanmakta, penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlerin yanı sıra CTX, CAZ, AZT gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin yer aldığı oksiminino sefalosporinleri de inaktive etmektedirler (7). Bununla birlikte, birçok durumda bu plazmidler diğer direnç genlerini de taşımaktadırlar. Bu nedenle GSBL pozitif olan bakterilerde aminoglikozidler, SXT ve tetrasiklinlere de direnç olağandır (7, 72, 81). Kinolon direnci çoğunlukla kromozomal olarak taşınmaktadır. Ayrıca son zamanlarda ortaya çıkan IBC-1 ve GES-1 tipi GSBL'ler integronlarla taşınmakta ve öncelikle seftazidimi hidrolize etmektedirler (51, 72, 82). Çalışmamızda SXT direnç gelişimi, bu ilacın hastanemizde sık kullanımına bağlanmıştır (Şekil 4). Nitekim bir bakım evinde 24 hastada ortaya çıkan çoklu ilaca dirençli *Klebsiella spp.* ve *E.coli* suşlarının kolonizasyonu için önceden CİP ve/veya SXT kullanımı bağımsız faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (83).

İspanya'daki bir hastanede izole edilen *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında KDT ile GSBL tesbit etmeye yönelik bir çalışma yapılmış. *E.coli* en çok (50, %92.6) izole edilen suş olmakla birlikte 40 (%80)'ı toplum kökenli suşlardan elde edilmiştir. İzolatların 39 (%97.5)'i idrar, bir tanesi üretral eksudadan elde edilmiş olup, GSBL pozitif 4 *Klebsiella spp.* suşundan üçü toplum kökenli idrar örneğinden izole edilmiştir. Toplum kökenli GSBL oranının yüksek çıkması ise, genelde hep hastane kökenlerinin çalışılması ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin toplumda ilk tercih edilen ilaçlar olması sebebiyle laboratuvarlarda çalışılmaması gösterilmiştir (84).

Hollanda'da yapılan bir çalışmada *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotikler IPM (%100-99.6) ve penisilinlerden TZP (%94.9-87.4) iken, sefalosporinlerden, *E.coli* için sefepim (%94.9) ve *Klebsiella spp.* için sefoksitin (%98.6-95.6) duyarlı bulunmuştur (85). Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise GSBL prevalansı *E.coli*'de %61, *Klebsiella spp.*'de ise %55 çıkmıştır (86).

Ariffin ve ark. (87) geniş spektrumlu antibiyotik alan pediatrik hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada MIC yöntemi ile en çok *Klebsiella spp.* (%36.5) izole edilmiş. *Klebsiella spp.* ve *E.coli* suşlarının genelinde CAZ (%50), CTX (%52) ve CRO (%50)'a yüksek oranda direnç saptanırken, IPM (%100) ve AK (%96) duyarlı bulunmuştur. GSBL pozitifliği tesbit edilen izolatların duyarlı olduğu antibiyotikler de yine IPM, AK ve CİP olmuştur.

Dandekar ve ark. (88) *K.pneumoniae*'da GSBL'nin diğer bakterilerden fazla bulunmasını bu bakteride spontan mutasyonların daha sık olmasına bağlamışlardır.

Bir Amerikan araştırma grubu, GSBL prevalansını *K.pneumoniae*'larda %9.6, *E.coli* izolatlarında ise %1.2 bulmuştur (89).

Kızırgil ve ark.'nın (90) yaptığı bir çalışmada GSBL üreten ve üretmeyen *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının broth mikrodilüsyon yöntemi ile MEM, CİP ve AK'e duyarlılıklarını karşılaştırdıklarında istatistiksel yönden anlamlı bulmamışlardır.

Malezya'da E-test ile GSBL, *E.coli* ve *Klebsiella spp.*'lerde sırasıyla %5.6-7.0 ve %36.7-38.0 olarak bulunmuş ve suşlar sefepim (%97.5) ve IPM (%100.0)'e duyarlı bulunmuşlardır (91).

Bangladeş'te ÇDST kullanılarak yapılan bir araştırmada *E.coli* ve *K.pneumoniae*'larda GSBL sırasıyla %43.2 ve %39.5 oranında tesbit edilmiştir (92).

Japonya'da geniş kapsamlı bir araştırmada, ÇDST ile *K.pneumoniae*'ların %90'nın GSBL ürettiği sonucuna varılmıştır (93).

Laboratuvarlarda rutin olarak yapılan duyarlılık testleriyle GSBL varlığını saptamak zordur. GSBL üreten bakterilerin prensip olarak monobaktamlara ve 3. kuşak sefalosporinlere dirençli olduğu kabul edilmektedir. Duyarlılık testlerinde bu antibiyotiklere direncin veya azalmış duyarlılığın görölmesi GSBL üretimi için uyarıcı olabilir. Bununla birlikte bu enzimleri üreten bazı bakterilerde direnç düşük düzeyde (MIC 4-16 µg/ml) olabileceği için rutin duyarlılık testleri ile ilaçlara karşı direnç veya orta derecede duyarlı sonucu alınmayabilir. Duyarlılık testleriyle klinik olarak önemli bir direnç mekanizmasının

saptanmasında başarısız olunması, plazmidler tarafından diğer bakterilere geçebilen bir direncin gizli kalıp görünüşte duyarlı bakterilerin bulunmasına ve tedavide ciddi sorunlara neden olur (94).

GSBL üreten bakterileri tespit etmek için birçok yöntem ortaya konmuştur, bunun için kullanılan testler; seftazidim direncine bakma, ÇDST, KDT, üç boyutlu test, E-test, daha yüksek bakteri yoğunluğu kullanma gibi yöntemlerin yanı sıra, klavulanik asitli besiyerinde disk diffüzyon, klavulanik asit kombinasyonlu MIC, otomatize Vitek ve Microscan gibi yöntemlerdir. Duyarlı bir yöntem olan üç boyutlu test pratikte uygulaması zor ve zaman alıcıdır (95).

Çalışmamızda *Klebsiella spp.* suşlarının; DDT ile %67, ÇDST ile %55, E-test ile %55’inde GSBL saptanmıştır (Tablo 9). ÇDST ile GSBL pozitif olan izolatların en çok CRO (%87), CTX (%85) ve AZT (%83)’a, GSBL negatif izolatların ise en fazla SXT (%80), CRO (%46) ve CAZ (%41)’e dirençli oldukları belirlenmiştir (Şekil 4).

Türkiye’nin dokuz laboratuvarından alınan örneklerde GSBL E-test kullanılarak ölçüldüğünde, kalite kontrol suşları ile karşılaştırılmış ve %91.1 doğruluk bulunmuştur (96).

Navon-Venezia ve ark. (97) İsrail’de KDT’ini kullanarak *Klebsiella spp.* suşlarında GSBL oranını %79, *E.coli*’de ise %53 bulmuşlardır. Ayrıca sefpodoksim/klavulanatın (CPD/CV) hassasiyetini %79, seftazidim/klavulanatın %66 ve sefotaksim/klavulanatın %91 saptamışlardır.

Özakın ve ark. (98) E-testi kullanarak *E.coli* suşlarının %5.96, *K.pneumoniae* suşlarının %44.77 ve *K.oxytoca* suşlarının %26.78’inde GSBL bulmuşlardır. Bunun yanı sıra toplum kaynaklı *E.coli* suşlarının %3.43’unda hastane kökenli olanların ise %9.35’inde GSBL tesbit etmişlerdir.

Evrensel ve ark.’nın (99) ÇDST ile yaptıkları bir araştırmada GSBL varlığını *Klebsiella spp.*’de %34 ve *E.coli*’de %57.8 bulmuşlardır.

Amerika’da yapılan başka bir çalışmada, agar dilüsyon yöntemi ile *K.pneumoniae*’larda GSBL oranı %44 olarak belirlenmiş, sefalosporin ve AZT kullanımı ile GSBL arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (100).

Ankara Başkent Hastanesi'nde ÇDST kullanılarak *E.coli* suşlarında GSBL varlığı toplum kökenli izolatlarda %7.8, hastane kökenli izolatlarında ise %9 olarak saptanmıştır. Bunların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırıldığında, toplum kökenli izolatların tedavisinde ofloksasin, hastane kökenli olanlarda ise karbapenemlerin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (101).

Başka bir çalışmada beta laktam+sulbaktam kombinasyonları araştırılmış ve GSBL üreten *K.pneumoniae*'lerin en çok sefotaksim/sulbaktam kombinasyonuna duyarlı oldukları saptanmıştır (102).

GSBL oranları ülkeden ülkeye ve hatta hastaneden hastaneye bile değişkenlik göstermektedir. Bu farklılık lokal epidemiyolojik faktörlere, genel enfeksiyon kontrol önlemlerine ve antibiyotik kullanım politikalarına bağlanmaktadır (103) ABD ortalama %3 oranına sahipken, Fransa'da *K.pneumoniae*'lerin GSBL üretme oranı %11.4 olarak tesbit edilmiştir. Genel olarak dünyanın birçok yerinde *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının GSBL üretme oranı %10-40 arasında değişmektedir (75).

Türkiye'de GSBL üretimi %11 ile %86.6 arasında değişmektedir. Bu farklılıkların sebebi ise; Türkiye'nin bölgelerinde sosyoekonomik ve kültürel değişkenliğin çok olması ve farklı hasta gruplarında farklı teşhis yöntemlerinin kullanılıyor olması, farklı ve yaygın antibiyotik kullanımındandır (104).

Çalışmamızın bir benzeri İngiltere'de, ÇDST ve E-test kullanılarak yapılmış, E-test ve ÇDST'lerinin sensitivitesinin %93 olduğu belirlenmiştir (105).

Essack SY. yaptığı çalışmada KDT'nin CAZ-CAZ/CV ve CPD-CPD/CV kombinasyonu kullanmış, CAZ'la kombinasyonun CPD kombinasyonuna göre daha doğru sonuç verdiği ve hiçbirinde yanlış pozitiflik görülmediğini vurgulamıştır (106).

E-test SHV ve TEM tipi GSBL'lerde %100 sensitiviteye sahiptir (107).

Benzer bir çalışmada ÇDST (kağıt diskler yerine Rosco tabletlerinin kullanıldığı), E-test, üç boyutlu test ve DDT'lerinin güvenilirliği araştırılmıştır. Üç boyutlu test GSBL

indikatörü olarak en iyi seçenek olarak görülmesine rağmen (sensitivitesi %90.6) teknik açıdan uygulama zorluğuna sebep olmuştur. DDT, diskler kombine olarak kullanıldığında bile GSBL'lerin ancak %52'sini, E-test ise %81.2'sini saptayabilmiştir. ÇDST'nin sensitivitesi %96.9 bulunmuştur. Üç testte TEM-12 tipi enzimi belirlemede yetersiz kalmıştır (108).

Yapılan iki ayrı çalışmada DDT GSBL'yi belirlemede yetersiz kalırken, inhibitör potansiyelize disk difüzyon testi ile ÇDST GSBL'yi doğrulamak için iyi birer seçenek olarak görülmüştür (109, 110). Buna karşın Cormican ve ark. (111) E-testi ÇDST'ye göre daha duyarlı bulmuşlardır. Emery ve Weymouth (112) seftazidim direncine bakarak GSBL izolatlarının ancak %39'unu tesbit edebilmişlerdir.

Bizim çalışmamızda DDT'nin (CAZ, CRO, CTX ve ATM birlikte) spesifitesi %65.3, sensitivitesi ise %93.1 olup CAZ en fazla (%82) 'GSBL şüpheli' izolatı ortaya çıkaran indikatör olmuştur. DDT'nin GSBL saptamadaki spesifitesinin düşük olması ve NCCLS kriterlerine göre ancak bir tarama testi olarak kullanılabilir olması ve TEM-7, TEM-12 ve SHV-2 gibi klavulanik asitli kombinasyonların kullanılmasını gerektiren enzimlerin varlığı sebebiyle DDT'nin doğrulayıcı bir test olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yirmidört *K.pneumoniae* suşunda GSBL varlığı E-test ve ÇDST ile karşılaştırılmıştır. E-test ile 12'sinde, ÇDST ile 15'inde enzim varlığını saptamıştır (106). Jarlier ve ark. (113) ÇDST'ni E-teste göre daha duyarlı bulmuşlardır. Abacıoğlu ve ark. (114) ise *K.pneumoniae* suşlarında iki testi karşılaştırmış ve E-testinde 24 suşun 12'sinde; ÇDST'inde CTX ile CAZ veya AZT diskleri kullanıldığında suşların 15'inde bu enzim varlığını saptamışlardır.

ÇDST uygulanmasında birtakım modifikasyonların yapılmasının sonucu etkilediği görülmüştür. Örneğin *Enterobacter spp.* ve *Citrobacter spp.* gibi IBL'si olan bakterilerde indüklenme nedeniyle zonlar küçüleceğinden diskleri yaklaştırıp 2 cm aralıklı yerleştirerek veya sefepim gibi IBL'den daha az etkilenen bir ajan kullanılarak; *P.mirabilis*'te ise GSBL düzeyinin düşük olması sebebiyle disk aralıkları 4 cm'ye çıkarılarak doğru sonuç alınabileceği belirtilmiştir (115). Kuzucu ve ark. (116) diskler arası mesafe 2 cm olduğunda 42 suшта GSBL üretimi saptarken, disk mesafesi 3 cm olduğunda ancak dokuz suшта sinerji testi pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Benzer bir çalışmada yine mesafe 2 cm olarak

alındığında poziflik saptama oranının arttığı gözlemlenmiştir (117). Bizim çalışmamızda ÇDST’inde diskler 2 cm aralıklı yerleştirilerek GSBL’yi daha doğru tesbit etmek amaçlanmıştır.

ÇDST’inde sefepim ilave edilerek modifiye edilen bir araştırmada dördüncü kuşak sefalosporinlerin üçüncü kuşaklara göre AmpC beta laktamaz varlığından daha stabil bileşikler olmaları sebebiyle GSBL belirlenme oranını arttırdığı iddia edilmiştir (118, 119).

E-test ve Vitek gibi yöntemler *E.coli* ve *K.oxytoca*’nın aşırı K1 üreten suşlarında gerçek GSBL’leri yanlış pozitif sonuçlardan ayırmada yetersiz kalmaktadır (120, 121, 122).

GSBL üretimi K1 beta laktamazından ayırt edilmelidir. K1 ve K1’e genetik açıdan yakın olan CTX-M tipi GSBL’ler, tipik olarak tüm penisilinler (temosilin hariç), sefuroksim ve AZT, az oranda CTX ve CRO’ya direnç gösterirken CAZ’a duyarlıdır (123, 124). K1, OXA, BIL-1 gibi enzimler klavulanik asitli inhibisyona dirençlidir (107).

ÇDST, diskler arası mesafenin önemi, klavulanatın tüm GSBL’leri teşhiste yetersizliği, GSBL ile birlikte kromozomal sefalosporinazları belirleyememesi ve klavulanatta depolanma esnasında disk potens kaybı gibi dezavantajları olan bir yöntemdir (123).

KDT, GSBL üreten suşlar için sefamisin ve beta laktamaz inhibitör kombinasyonları, AmpC enzimi için dördüncü kuşak sefalosporinler ve *K.oxytoca*’da aşırı üretilen K1 enzimi için ise CAZ test edilerek sonuca ulaşmada mükemmel bir test gibi görünmektedir (124, 125). Bu testte CPD kullanıldığında %2 oranında yanlış pozitifliğe rastlanmıştır (126). Ancak CPD ülkemizde henüz kullanılmayan bir antibiyotiktir.

İnokülüm etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 5×10^5 cfu ve 5×10^8 cfu inokülümları kullanılarak çeşitli antibiyotiklerin etkisi araştırıldığında, beta laktamaz üreten izolatlarda bu değişimden meropenem ve sefotetanın en az, AK ve TZP’nin az, oksimino sefalosporinlerin en fazla etkilendiği ortaya çıkmıştır (127). Benzer bir çalışmada standard inokülümde TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL’ler ile K1 tipinde yanlış negatif sonuç alınmıştır. Yüksek inokülümlarda klavulanat GSBL’leri inhibe edememiştir. Nedeni ise, beta laktamazın sayısı, tipi ve miktarı, dış zar geçirgenliği, efflux sistemi, PBP duyarlılığı ve üreme fazı olarak gösterilmiştir (128). Buna karşın, son zamanlarda yapılan bir araştırmada yüksek inokulumda

MIC değeri yükselmesine rağmen, inokulum düşük olması halinde bakteriyi öldürmede farmakodinamiğin değişmediği bildirilmiştir (129).

Filiz F. Orak'ın (130) yaptığı çalışmada E-test GSBL'nin iki farklı stripiyle üç örnekte farklı sonuç alınması, üçüncü kuşak sefalosporinlerden hiçbirinin tek başına bütün GSBL'leri tesbit edememesi, bunun da yüksek benzerlik oranına rağmen GSBL substrat profillerinin farklılıklar göstermesinden kaynaklanacağı düşündürmektedir. Farklı GSBL tipleri için optimal substrat profillerinin değişmesi nedeniyle tek bir beta laktam ajanla rutin test uygulanmasının bu enzimleri saptamada yetersiz kalacağı görüşü hakimdir (111). Bizim çalışmamızda MIC testi olarak mikrodilüsyon testi yerine E-testi tercih etmemizin nedeni; E-testin uygulanmasının daha kolay olması, sonuçların inokulum yoğunluğu, predifüzyon süresi ve bakteri üreme fazı gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilenmemesidir (131). Buna karşılık E-test teknik açıdan kullanımı titizlik gerektiren ve diğer testlere göre daha pahalı bir yöntemdir.

İnhibitör dirence spesifik mutasyonların GSBL ile kombine olduğu durumlarda, 'kompleks mutant enzim' oluşacak ve inhibitörlere direnç olması sebebiyle rutin GSBL testleri ile saptanamayacaktır (132). Çalışmamızda ÇDST ve E-testin sensitivitesinin yüksek olması, hastanemiz suşlarında daha çok TEM veya SHV tipi enzimlerin üretildiğini düşündürmektedir. Bundan dolayı GSBL'yi teşhis etmeye yönelik inhibitör kombinasyonlu testler de yetersiz kalmakta, mutlaka ek bir teste ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, dış zar proteini profillerinde (OmpF ve OmpC eksikliği gibi) değişiklik, klavulanik asit tarafından inhibe olmayan beta-laktamazların varlığı ve *K.pneumoniae*'de düşük düzeyde salgılanan AmpC kromozoma bağlı beta laktamazın salgılanması gibi faktörler dirence katkıda bulunmaktadır (79).

GSBL kolonizasyonu ve enfeksiyonu için risk faktörlerini araştırdığımızda, mekanik ventilatöre bağlı olan hastalarda GSBL görülme sıklığı anlamlı bulunmuştur. Yakın zamanda operasyon geçirmiş olmak ise sadece E-test yöntemiyle ilişkili bulunurken, Nazogastrik sonda olan hastalarda GSBL pozitifliği ise sadece ÇDST ile anlamlı bulunmuştur. Diğer faktörlerle GSBL arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, Mulazımoğlu L.'nin yaptığı çalışmada GSBL açısından risk faktörleri (yaş, cinsiyet, hastanede kalış süresi, hastalığının ağırlık derecesi, üriner kateter ya da mekanik ventilatör varlığı ile bakteriyemiden iki hafta öncesine kadar olan sürede antibiyotik kullanımı) araştırılmıştır ve önceden üçüncü kuşak sefalosporinlerle tedavi edilmiş olmak tek bağımsız risk faktörü olarak bulunmuştur ($p=0.008$) (133). Benzer bir çalışma da, *K.pneumoniae* suşları için oksiiimino halkası içeren antibiyotiklerin kullanımı GSBL üretimi için risk faktörü olarak görülmüştür (134).

Lin MF, Huang ML, Lai SH'nin yaptığı çalışmada *K.pneumoniae*'lerin GSBL üretimi açısından trakeostomi, foley kateter bulunması, endotrakeal tüp, NG, santral venöz kateter ve CAZ kullanımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (135).

Agata ED. ve ark.'nin yaptığı çalışmada önceden antibiyotik kullanımı, altta yatan hastalık, APACHE III skorları, hastanede kalış süresi açısından iki grup karşılaştırılmış, fakat aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Hemodiyaliz istatistiksel açıdan tek anlamlı değişken bulunmuştur (136).

Lautenbach E. ve ark.'nin yaptığı çalışmada GSBL üretimi için antibiyotik tedavisinin süresi bağımsız bir risk faktörü iken, GSBL ile hastalarda santral venöz kateter bulundurma ve diabet olması orta derecede anlamlı, hastanede kalış süresi, yaş ve cinsiyet arasında ise anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (137). Rebeck JA. ve ark.'nin yaptığı çalışmada ise GSBL pozitifliği saptanan hastaların çoğunun beş yaşından küçük olması ve çok sayıda santral venöz kateteri olan hastalar olması dikkat çekicidir (138). Kendi alışmamızda da GSBL pozitifliği ağırlıklı olarak 0-1 yaş grubundaki hastalarda tesbit edilmiştir.

Bizim alışmamızda olduğu gibi diğer çalışmalarda da risk faktörleri açısından farklılıkların olmasının sebebi bir görüşe göre; çalışmanın retrospektif karakterde olması, hasta sayısının yetersizliği, kolonizasyonu gerçek enfeksiyondan ayırmada bir görüş birliği olmaması, hastaların hastaneye kabulünden veya enfeksiyonlarından önce antibiyotik kullanımları ile ilgili yetersiz verilerin bulunması ve izolatların sadece belli servislerden toplanmış olması olarak görülmektedir (139).

GSBL'lerin ortaya çıkmasında en önemli mekanizmalardan birisi; özellikle hastanelerde üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımına bağlı oluşan selektif baskıdır (87, 140). Bunun yanında GSBL üreten bakteriler, hastane personeli solunum, orofarinks, gastrointestinal yol, yara ve idrarında kolonize olmaları ve kontamine el ve streteskopları ile yayılmaktadırlar (135). Hastanelerde, geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklere direnç varlığının belirlenmesi ve bu direncin izlenmesi, HE epidemilerinin ortaya çıkmasını ve yayılmasını azaltmada yararlanılması gereken bir kontrol yöntemidir.

GSBL varlığını saptamaya yönelik olarak, üç boyutlu test ve dilüsyon yöntemleri pratikte uygulanmaları zor ve zaman alıcı testlerdir. ÇDST ve KDT laboratuvarlarda sık kullanılan, maliyet açısından pahalı olan ve bazen beta-laktamaz inhibitörünün beta-laktam antibiyotik tarafına doğru diffüzyonu sonucu okunma zorluğu yaratan E-test birbirlerine yakın duyarlılığa sahip testlerdir. Bu sebeple fenotipik doğrulayıcı testler olarak gerek ÇDST ve gerekse NCCLS'in önerdiği bir test olan KDT pratik ve her laboratuvarında uygulama kolaylığı olan yöntemlerdir. KDT'nin bir avantajı da sadece iki disk kullanma kolaylığı sağlamasıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 100 suşun 87'sini *K.pneumoinae*, 13'ünü *K.oxytoca* oluşturmuştur. *K.pneumoinae* suşlarının 49'unda (%56.3), *K.oxytoca* suşlarının 6'sında (%46.5) GSBL üretimi saptanmıştır.

2. Suşların çoğunluğu (%21) idrar kültüründen izole edilmiştir.

3. DDT ile *Klebsiella spp.* izolatları trimetoprim/sülfometaksazol'e dirençli (%80) iken; imipenem hem GSBL pozitif hem de negatif izolatların duyarlı olduğu antibiyotik olmuştur. GSBL pozitif suşlarda en fazla seftriakson olmak üzere tüm oksimino sefalosporinlere direnç gözlenmiştir. Rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde bu antibiyotikler duyarlı görünseler bile dirençli olarak rapor edilmelidir.

4. E-test'in sensitivitesi %100.0 spesifitesi %71.6, ÇDST'nin sensitivitesi %100.0 spesifitesi %86.6 ve DDT'nin sensitivitesi %93.2, spesifitesi ise %75.3 bulunmuştur. DDT'leri GSBL üretimini belirlemede yalancı pozitiflikler nedeniyle yetersiz kalırken, klavulanik asit kombinasyonlu testler tercih edilmelidir.

5. ÇDST ile toplam 55 suшта (%55) GSBL üretimi saptanırken, ÇDST ile negatif olan 12 suşun DDT ile pozitif bulunması yalancı negatiflik olasılığını ortaya koymaktadır.

6. Klavulanik asit inhibisyonuna dayalı bu testlerin kullanımını kısıtlayan çeşitli nedenler bulunmaktadır. Bunlar; inhibitöre dirençlilik ve AmpC gibi beta laktamazların birlikte bulunması ve GSBL üretiminin maskelenmesi, bu enzimlerinin farklı tiplerinin farklı substrat afiniteleri olması sebebiyle tek bir ajan kullanmanın yetersizliği gibi nedenlerdir.

7. Ancak laboratuvarımızda GSBL üretiminin yüksek düzeyde bulunması hastanemizdeki izolatların çoğunun klavulanik asitle inhibisyona duyarlı olduklarını düşündürmektedir.

8. DDT dışındaki iki test GSBL üretimini rutin laboratuvarlarda tayin etmek açısından iyi birer seçenek gibi görülmektedir. Ancak, E-testin uygulanmasının titizlik gerektirmesi, diğerlerine göre pahalı bir yöntem olması ve bazen beta laktamaz inhibitörünün beta laktam antibiyotik tarafına difüzyonu sonucu değerlendirme zorluğu yaratması, ÇDST'inin ise diskler arası mesafenin sonucu etkilemesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.

9. Önerimiz; literatür verilerine göre GSBL üreten suşlar için sefamisin ve beta laktamaz inhibitör kombinasyonları, AmpC enzimi için dördüncü kuşak sefalosporinler ve

K.oxytoca'da aşırı üretilen K1 enzimi için ise seftazidim test edildiğinde KDT sonuca ulaşmada mükemmel bir test gibi görünmektedir.

10. Mekanik ventilatöre bağlı olmak, nazogastrik sonda ve yakın zamanda geçirilmiş bir operasyon ile GSBL üretimi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

11. GSBL üreten bakterilerin hastane personeli, solunum, orofarinks, gastrointestinal yol, yara ve idrarında kolonize olmaları ve kontamine el ve steteskoqları ile yayılmaktadırlar. Hastanelerde, bu konuda gerekli stratejilerin geliştirilmesi, geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklere direnç varlığının belirlenmesi ve bu direncin izlenmesi, HE epidemilerinin ortaya çıkmasını ve yayılmasını azaltmada yararlanılması gereken bir kontrol yöntemidir.



KAYNAKLAR

1. Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) var, ANKEM Derg 2004; 18 (Ek 2): 98-103.
2. Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 1983; 12: 507-510.
3. Taşova Y. Gram negatif enterik bakteri infeksiyonlarının yönetimi, ANKEM Derg 2011;25 (Ek 2) :34-44
4. Sanders CC. Beta Lactamases of gram negative bacteria: New challenges for new drugs, Clin Infect Dis 1992; 14 (5):1089-099.
5. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended spectrum beta lactamase producing organisms, J Hosp Infect 2009;73 (4):345-354.
6. Bush K. New beta lactamases in gram negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32 (7):1085-099.
7. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe the Americans, and the Western Pasific Region. Clin Infect Dis 2001; 32(Suppl2): 94-103
8. Beindenbach DJ, Moet G J, Jones R. Occurence and antimicrobial resistance pattern comparisions among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial surveillance program (1997-2002). Diag Microb Infect Dis 2004; 50: 59-69.
9. Işık F, Arslan U, Tuncer İ. Klinik örneklerden soyutlanan Klebsiella türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve antibiyotik duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi 2007; 21: 33-38.
10. Gür D, Gülay Z, Akan Arıkan Ö ve ark. Türkiye’de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni betalaktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: çok merkezli HİTİT sürveyansının sonuçları. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 537-544.
11. Mac Kenzie FM, Gould IM. Extended spectrum β - lactamases. J Infect 1998; 36: 255-258.
12. Bilgehan H. Enterobacteriaceae Familyası. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Bilgehan H., İzmir: 2000; 101-103

13. Ewing WH. The genus *Klebsiella* identification of Enterobacteriaceae. Edwards PR, Ewing WH (editors). Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed., New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier Science Publishing Company Inc.1986; 365-380
14. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorf Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid coded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob Agent Chemother 1985; 28:302-307.
15. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. Ünal S, Vahaboglu H, Leblebicioglu H, Öztürk R, Köksal (eds). Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; syf. 13-26.
16. Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. Klimik Derg; 2001;14 (1): 47-55.
17. Leblebicioglu H, Usluer G, Ulusoy S, Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2008; 285-329.
18. Essack SY. The development of beta lactam antibiotics in response to the evolution of beta lactamases, Pharmaceutical Resaearch 2001;18 (10): 1391-399.
19. Nikaido H. Crossing the envelope; how cephalosporins reach their targets, Clin Microbiol Infect 2000; 6 (Suppl 3): 22-26.
20. Hancock REW. Resistance mechanisms in pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram negative bacteria, Clin Infect Dis 1998;27(Suppl 1): 93-99.
21. Medeiros AA. Cooperative evolution of mechanisms of β -lactam resistance. Clin Microbiol Infect 2000; 6 (Suppl 3): 3-5.
22. Martine Martinez L, Conejo MC, Pascual A et al. Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta lactamase and showing altered porin profiles, Antimicrob Agents Chemother 2000;44 (9) :2534-536.
23. Poole K. Efflux mediated multiresistance in gram negative bacteria Clin Microbiol Infect 2004;10 (1):12-26.
24. Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2000:236-252.
25. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar, Flora 2001;6 (Ek 1): 3-23.

26. Mederios AA. Beta lactamases. Br Med Bull 1984; 40 (1) :18-27.
27. Bush K, Jacoby G. Nomenclature of TEM β -lactamase, J Antimicrob Chemoter 1997; 39 (1):1-3.
28. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe, J Antimicrob Chemoter 2007; 59 (2):165-174.
29. Poirel L, Nordman P. Acquired carbapenem hydrolysing beta lactamases and their genetic support, Curr Pharm Biotechnol 2002; 3 (2):117-127.
30. Bradford PA. Extended spectrum beta lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, Clin Microbiol Rev 2001; 14 (4):933-951.
31. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O. ve ark. Hastane infeksiyonu etkeni Pseudomonas aeruginosa' larda çeşitli antibiyotiklere direnç ve İBL yapımının araştırılması, Klimik Derg 2004; 17(1): 47-49.
32. Günseren F, Mamıkoglu L, Öztürk S. et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey, J Antimicrob Chemoter 1999; 43 (4):373-378.
33. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemoter 2001; 47 (3):247-250.
34. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem hydrolyzing beta lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae by disk tests, Journal of Clin Microbiol 2006;44(6): 1971-976.
35. Lavigne J.P, H. Marchandin, J.Delmas N. et al. qnrA in CTX-Mproducing Escherichia coli from France, Antimicrob Agents Chemoter 2006; 50 (12):4224–228.
36. Saladin M, V. T. Cao, T. Lambert J. et al. Diversity of CTX-M beta lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospital, FEMS Microbiol. Lett, 2002: 209(2):161–168.
37. Ünal S, Vahaboglu H, Leblebicioglu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. In: Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar; Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004: 5-13.
38. Stürenburg E, Mack D. Extended spectrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control, Journal of Infect Dis 2003; 47(4): 279-359.

39. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, et al. Oxacillinase mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents Chemother* 2001; 45(9): 2615-620.
40. Ângela N, Rafael C, Teresa M, et al. Mutational events in cefotaximase extended spectrum β -lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance, *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(7): 2377–382.
41. Bonnet R. Minireview: Growing group of extended spectrum B-lactamases: The CTX-M enzymes, *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (1):1-14.
42. Medeiros AA. β - lactamases: Quality and resistance, *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 (Suppl 4) :452-459.
43. Negri MC, Morrossini MI, Blazquez J, Bacquero F. Antibiotic resistance in hospital infections: The role of newer cephalosporins, *Clin Microb Infect* 2000; 6(3):95-97.
44. Uyanık M H, Hancı H, Yazgı H, Karamese M. Kan kültürlerinden soyutlanan *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında GSBL sıklığı ve ertapenem dahil çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 2010; 24(2):86-91.
45. Tonkic M, Barisic I. Prevalence and antimicrobial resistance of extended spectrum beta lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split. *Int Microbiol* 2005; 8: 119-124.
46. Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 657-686.
47. Livermore D. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2): 165-174.
48. T.M. Coque, F. Baquero, R. Canton. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro surveillance* 2008; 13: 47: 1-11.
49. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended spectrum beta lactamases, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622-632.
50. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M type beta lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14:137-142.
51. Gür D. Beta laktamazlar. *Flora* 1997; 3(Ek-1) : 1-16

52. Rice L. Extended spectrum lactamase: Evolution and clinical importance. CHEST 2001; 119(2 suppl): 391-396
53. Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant *K.pneumoniae* from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta lactamases in a single isolates. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 761-766.
54. Christopher L, Weymouth E, "Detection and clinical significans of Extended Spectrum Beta Lactamases in Tertiary Care Medical Center", J.Clinical Microbiolology, (35): 2061-067.
55. Pitout JDD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of doubledisk test for the detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum and AmpC beta lactamases. J Clin Microbiol. 2003; 41 (8): 3933-935
56. Thomson KS. Controversies about extended spectrum and Amp-C beta lactamases. Emerg Infect Dis. 2001; 7 (2): 333-336
57. Barroso H, Freitas VA, Lito LM. Survey of *K.pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 611-616.
58. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S16. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2010
59. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *K.pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol 2010; 48(12): 4417-425.
60. Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, Clifton Hadley F: Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains, J Antimicrob Chemother 2009;63(2):302-308.
61. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-233.

62. Matthew M, Harris AM, Marshall MM, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-178.
63. Tham TN, Mabilat C, Courvalin P, Guesdon JL. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 69: 109-116.
64. Tenover FC, Rajinder K, Williams PP. Carbapenem resistance in *K.pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8): 1209–13.
65. Jain S, Andrews J, Fraise A, Brenwald N. Rapid detection of extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacilli in blood cultures. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3): 652-654.
66. Réglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, et al: Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta lactamases, *J Med Microbiol* 2008; 57(3): 310-315.
67. Spencer RC. Epidemiology of infection in ICUs. *Intensive Care Med*, 1994; 20: 2-6.
68. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Tikarsilin klavulanik asit'in hastane enfeksiyon etkeni gram negatif basillere etkinliğinin E-test ile araştırılması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003; 28: 60-64.
69. Köseoğlu Ö, Gür D, Akova M. Nosocomial bloodstream infections in a turkish university hospital: Study of gram negative bacilli and their sensitivity patterns. *Inter J. Antimicrob Agents*, 2001; 17: 477-481.
70. Kocazeybek BS. Antimicrobial resistance surveillance of gram negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey. *Chemotherapy*, 2001; 47: 396-408.
71. Şener GA, Yüce A. İmipenem, meropenem ve sefoperazon sulbaktamın etkinliği. *DEU Tıp Fakültesi Dergisi*, 2001: 325-330.
72. Kocazeybek BS, Arabacı Ü. Use of E-tests with carbapenems for gram negative rods producing beta lactamases. *Inter J Antimicrob Agents*, 2002; 19: 159-162.
73. Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribiero J, Turner P. *K.pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. *Braz J Infect Dis*, 2004; 8(1): 1-5.

74. Babini G, Livermore DM. Antimicrobial resistance among *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother*, 2000; 183-189.
75. Colodner R. ESBL's. A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am J Infect Control*, 2005; 33: 104-107.
76. Skopkova-Zarnayova M, Siebor E, Rovna D, Bujdakova H, Neuwirth C. Outer membrane protein profiles of clonally related *K.pneumoniae* isolates that differ in cefoxitin resistance. *FEMS Microbiol Lett*; 243: 197-203.
77. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Sanchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. Characterization of the extended spectrum beta lactamase reference strain, *K.pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Chemother*, 2000: 2382-388.
78. Vahaboğlu H. Beta laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi. *Flora*, 1998; 3: 73-79.
79. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, Fridkin SK, Jevitt L, McGowan JE. Evaluation of the NCCLS extended spectrum beta lactamase confirmation methods for *E. coli* with isolates collected during project ICARE. *J Clin Microbiol*, 2003: 3142-146.
80. Yaman A, Taşova Y, Kibar F, İnal AS, Saltoğlu N, Büyükçelik Ö, Kurtaran B, Dunder İH. Investigation of the antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing nosocomial infections. *Saudi Med J*, 2004; 25(10): 1403-409.
81. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Concurrent outbreaks of ESBL producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999; 489-499.
82. Tzelepi E, Magana Ch, Platsouka E, Sofianou D, Paniara O, Legakis NJ, Vatopoulos AC, Tzouveleksi LS. ESBL types in *K.pneumoniae* and *E.coli* in two Greek hospitals. *Int J Antimicrobial Agents*, 2003; 21: 285-288.
83. Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K, Weinstein. Multiple antibiotic resistant *Klebsiella* spp. and *E.coli* in nursing homes. *JAMA*, 1999; 281: 517-523.

84. Sorlozano A, Gutierrez J, Palanca M, Soto MJ, Piedrola G. High incidence of ESBL's among outpatient clinical isolates of E.coli: A phenotypic assessment of NCCLS guidelines and a commercial method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004; 50: 131-134.
85. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta lactam susceptibilities and prevalence of ESBL producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 24: 585-591.
86. The Indian antimicrobial Resistance Study Group, Mathia D, Rhomberg PR, Biedenbach DJ, Jones RN. Evaluation of the in vitro activity of six broad spectrum beta lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: A survey of ten medical center laboratories. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002; 44: 367-377.
87. Ariffin H, Navaratnam P, Kee TH, Balan G. Antibiotic resistance patterns in nosocomial gram negative bacterial infections in units with heavy antimicrobial usage. *J Trop Ped*, 2004; 50: 26-31.
88. Meriotte s, Nordmann P, Nicolas MH. Extended spectrum beta lactamases in *P. mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*, 1994; 34: 923-925.
89. Dandekar PK, Tetreault J, Quinn JP, Nightingale CH, Nicolau DP. Prevalence of ESBL producing E.coli and Klebsiella isolates in a large community teaching hospital in Connecticut. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004; 49: 37-39.
90. Kizirgil A, Demirdağ K, Özden M, Bulut Y, Yakupoğulları Y, Toraman ZA. In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing E.coli and *K.pneumoniae* blood isolates. *J Microbiol Res* 2004; 3: 1-6.
91. The Malaysia / Singapore Antimicrobial Resistance Study Group, Biedenbach D, Lewis MT, Jones R. In vitro evaluation of cefepime and other broad spectrum beta lactams for isolates in Malaysia and Singapore medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 35: 277-283.
92. Rahman MM, Haq JA, Hossain MA, Sultana R, Islam F, Islam S. Prevalence of ESBL producing E.coli and *K.pneumoniae* in a urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 24: 508-510.
93. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of ESBL's in clinical isolates of E.coli and *K.pneumoniae* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184: 53-56.

94. Thomson KS, Sanders CC. Detection of ESBL in members of the family Enterobacteriaceae: Comparison of the Double disk and three dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992; 36: 1877-882.
95. Legrand P, Fournier G, Bure A, Jarlier V. Detection of extended broad spectrum beta lactamases in Enterobacteriaceae in four french hospitals. *Eur J Microbiol Infect Dis*, 1989; 8: 527-529.
96. The Turkish Antimicrobial Resistance Study Group, Pfaller MA, Korten V, Jones R, Doern GV. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for seven broad spectrum beta lactams in Turkey using the E-test method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 35: 65-73.
97. Venezia SN, Munz OH, Schwartz D, Turner D, Kuzmenko B, Carmeli Y. Occurrence and phenotypic characteristics of ESBL among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel Aviv center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. *J Clin Microbiol* 2003: 155-158.
98. Özakın C, Sınırtaş M, Sevgican E, Kazak E. Comparison of the E-test method with an automated bacterial identification and antimicrobial susceptibility detection system for screening ESBL producers. *Scand J Dis*, 2003; 35: 700-703.
99. Evrensel N, Koç N, Sümerkan B. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen gram negatif basillerde ESBL saptanması. *Flora*, 1997; 2: 105-108.
100. Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: Epidemiology and relation to antibiotic usage pattern. *Antimicrob Chemother*, 2000; 45: 895-898.
101. Gürdoğan K, Arslan H. Hastane kökenli ve hastane dışı E.coli'lerde ÇDST ile ESBL araştırılması ve izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumu. *Flora*, 1999; 4: 177-180.
102. Wang FD, Lin ML, Lee WS, Liu CY. In vitro activities of beta lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against gram negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 2003; 23: 590-595.
103. Sirot DC, Goldstein FW, Soussy CJ. Resistance to cefotaxime and seven other beta lactams in members of the family Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *Antimicrob Chemother*, 1992; 27:441-457.

104. Aktaş E, Yiğit N, Yazgı H, Ayyıldız A. Detection of antimicrobial resistance and ESBL production in *K.pneumoniae* strains from infected neonates. *J Int Med Res.* 2002; 30: 445-448.
105. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of ESBL in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *Antimicrob Chemother*, 2000; 45: 881-885.
106. Essack SY. Laboratory detection of ESBL's The need for a reliable, reproducible method. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2000; 37: 293-295.
107. Brown DFJ, Andrews J, King A, MacGowan P. Detection of ESBL's with E-test and double disc potentiation methods. *Antimicrob Chemother*, 2000; 46: 323-342.
108. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of ESBL's and their prevalence among blood isolates of *E.coli* and *Klebsiella* spp. in a belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol*, 1997; 3: 2191-227.
109. Ho PL, Tsang NC, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection of ESBL's and their prevalence among *E.coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *APMIS*, 2000; 108: 237-240.
110. 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 ESBL's in *E.coli* and *K. pneumoniae*. *Antimicrob Chemother*, 1998; 42: 49-54.
111. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of ESBL producing strains by the E-test ESBL screen. *J Clin Microbiol*, 1996; 4: 1880-884.
112. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of ESBL's in a tertiary care medical center. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 2061-067.
113. Jarlier V, Nicokas MH, Fournier G, Philippon A. ESBL conferring resistance to newer beta lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 1988; 10: 867-868.
114. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. ESBL saptanmasında E-testi ile ÇDST'lerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 1995; 9(1-2): 93-95.
115. Çiğdem B. Antibiyotik duyarlılık testlerinin hasta izleminde kullanımı: Beta laktamaz testleri ve rutinde kullanımları. Editör: Deniz G, Sümerkan B, Dündar V,

Söyletir G. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı, İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Turgut Yayıncılık ve Ticaret, 1997: 101-109.

116. Kuzucu Ç, Kabakçioğlu M, Özışık A, Ezen F, Acar NS. Nozokomiyal gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta laktamaz varlığının saptanması. *Flora*,1999; 4: 102-106.
117. Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N. Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi. *İnfeksiyon Dergisi*, 1995; 9: 88-92.
118. Pitout JDD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double disk test for the detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum and AmpC beta lactamses. *J Clin Microbiol*, 2003; 3: 3933-935.
119. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP. Characterization of clinical isolates of *K.pneumoniae* from 19 laboratory standards ESBL detection methods. *J Clin Microbiol*, 2001; 3: 2864-872.
120. Hall MAL, Fluit AC, Paauw A, Box ATA, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the E-test ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for detection of ESBL's in multiresistant *E.coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*, 2002; 2: 3703-711.
121. Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. Detection of ESBL in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disc method. *J Clin Microbiol*, 2000: 4228-232.
122. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Cicaglione D, Romano L. Characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix ESBL detection method. *J Clin Microbiol*, 2003: 1463-468.
123. Büyükbaba Ö, Aydın D, Anğ Ö. İdrar yolu infeksiyonu etkeni gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi, *Klinik Dergisi*, 1996; 9: 27-30.
124. Midolo PD, Matthews D, Kerr F&TG. Detection of ESBL's in the routine clinical microbiology laboratory. *Pathology*, 2002; 34: 362-4.
125. Komatsu M, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, Fukuda S, Matsuo S, Iwatani Y. Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for Enterobacteriaceae producing, ESBL's isolated in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 46: 125-130.

126. Quiroga M, Lezcano MT, Gerula P. Comparison of screening methods for detection of ESBL producing strains isolated in Posadas, Misiones, Argentina. *Int J Antimicrob Agents*, 2002; 20: 307-308.
127. Segatore B, Setacci D, Perili M, Franchino L, Franceschini N. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Enterobacteriaceae producing complex beta lactamase patterns including extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 23: 480-486.
128. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and beta lactamase activity in AmpC and ESBL producing E.coli and K.pneumoniae clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (1); 269-275.
129. Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Clinical implications of ESBL producing Klebsiella species and E.coli on cefepime effectiveness. *J Infect*, 2004; 6: 1-7.
130. Filiz F. Orak, Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan gram negatif Bakterilerde Direnç Paterni ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (ESBL) Tayini İnfeksiyon Dergisi,1995; 9(1-2): 96-98.
131. Keskin K. Yeni bir antibiyotik duyarlılık testi: E-test. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı. Ağaçfidan A, Badur S, Gülekçi G, İstanbul: Turgut Yayıncılık ve Anonim Şirketi, 1996; 25: 48-51.
132. Fielt J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Mordarska HP, Hryniewicz M. A novel complex mutant beta lactamas, TEM-68, identified in a K.pneumoniae isolate from an outbreak of ESBL producing Klebsiellae. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000: 1499-505.
133. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y. ESBL producing E.coli and K.pneumoniae bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med*, 2002; 28: 1718-723.
134. Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV, Mulazımoğlu L. International prospective study of K.pneumoniae bacteremia: Implications of ESBL production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004; 140: 26-32.

135. Lin MF, Huang ML, Lai SH. Risk factors in the acquisition of ESBL *K.pneumoniae*: a case control study in a district teaching hospital in Taiwan. *J Hosp Infect*, 2003; 53: 39-45.
136. Agata ED, Venkataraman I, deGirolami P, Weigel L, Samore M, Tenover F. The molecular and clinical epidemiology of Enterobacteriaceae producing ESBL in a tertiary care hospital. *J Infect*, 1998; 36: 279-285.
137. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. ESBL producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*, 2001; 32: 1162-171.
138. Rebeck JA, Olsen KM, Fey PD, Langnas AN. Characterization of an outbreak due to ESBL producing *K.pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *Clin Infect Dis*, 2000; 31: 1368-372.
139. Siu LK, Lu PR, Hsueh PR, Lin FM, Chang SC, Luh KT, Ho M, Lee CY. Bacteremia due to ESBL producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol*, 1999: 4020-027.
140. Akyıldız R, Özsoy F, Altunay H, Koçak N, Çavuşlu Ş, Yenen OŞ. *K.pneumoniae* suşlarında ESBL sıklığı ve beta laktam antibiyotik direncinin araştırılması. *Klinik Dergisi*, 1998; 11: 53-58.