

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmaları içerisinde bakterilerin oluşturduğu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) önemli bir yer tutar. Antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımı sonucu gelişen direnç çok önemli bir sorundur. Direnç özellikleri, çoğu kez türden türe genetik maddelerle aktarılmaktadır. Gram negatif bakterilerde SHV-tipi enzimler en sık karşılaşılan beta laktamaz enzimleridir. Bu enzimlerin yapısında bir veya birkaç amino asit değişikliği ile oluşan çeşitli GSBL' ler antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımına bağlı olarak giderek artan oranlarda saptanmaktadır.

GSBL' ler çoğunlukla *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde bulunmaktadır. Bu direnç genlerinin seçilmesi ve yayılması için en uygun ortam antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı hastanelerdir. Hastane suşları çoğu kez direnç genlerini taşıyan suşlardır. Direnç genleri her zaman rutin duyarlılık testlerinde tanınmaz ve bakterinin taşıdığı tehlike anlaşılamayabilir. Hastane suşlarının direnç türlerini özel yöntemlerle izlemek gereklidir. Ancak bu şekilde direncin yayılma potansiyeli anlaşılabılır. Bir başka noktada hastane suşlarının belki de yarıya yakını genetik olarak direnç özellikleri taşıdığı halde antibiyotiklere rutin testlerde duyarlı bulunmasıdır. GSBL' ler gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama dirençten sorumlu enzimlerdir. Bu enzimler plazmidler aracılığı ile taşınmaları ve antibiyotiklerin gereksiz kullanımı sonucu hızla yayılmaktadırlar. Ayrıca bu enzimlerin rutin mikrobiyolojik testlerle gözden kaçabilmesi sorun yaratmaktadır. Bu sorunların giderilmesi için, mikrobiyolojik testlerin yanında

bu testlere göre daha hassas, duyarlı ve spesifik olan moleküler teknikleri kullanmanın bir çok yararı olacaktır. GSBL' lerin varyantlarının bulunma sıklıkları ülkeler arasında ve aynı ülke içinde hastaneler arasında farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae*' nin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyonla belirlenmiş izolatlarında RSI-PCR çalışılarak SHV-tipi beta-laktamazların bulunma oranı, yayılımı ve varyantları saptanacaktır. Ayrıca hastane enfeksiyonlarının önemli nedenlerinden olan dirençli bakterilerdeki direnç genlerinin varlığı ve yapılarının belirlenmesi, transformasyon yollarının saptanması amaçlanmıştır. Direnç oranları hasta örneklerinde kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin rutin yapıldığı hastanelerde daha iyi belirlendiğinden, araştırma bölgesi olarak Gazi Hastanesi seçilmiştir.

## II. GENEL BİLGİLER

*Klebsiella* cinsi bakteriler *Enterobacteriaceae* ailesinin genel karakterlerini taşımaktadırlar<sup>1</sup>.

0,7–1,5×2,0–5,0 µm boyutlarında, ikişer ikişer veya kısa zincir oluşturan, hareketsiz, sporsuz, etraflarında polisakkarit kapsülü olan gram negatif çomakçıklardır<sup>2</sup>.

Kapsülünün bulunması *Klebsiella* kolonilerinin mukoid görünümde olmasını, fagositozlara karşı korunmasını ve fırsatçı patojen haline gelmesini sağlamaktadır<sup>3</sup>.

*Klebsiella* cinsi adını, 19 uncu yüzyılın sonlarında yaşamış, Alman mikrobiyoloğu Edwin Klebs’ ten almıştır. Daha sonraları, *Klebsiella pneumoniae*’ nın yaptığı ağır öldürücü pnömoni tablosunu araştırmacı Carl Friedlander ayrıntılı bir biçimde tanımlamıştır. Bundan dolayı *Klebsiella pneumoniae* yıllarca “Friedlander basili” olarak adlandırılmıştır<sup>1</sup>.

*Klebsiella* cinsi bakteriler sıklıkla kalın bağırsakta bulunsalar da, normal vücut florasında, üst solunum yolunda, üriner sistemde, kanda, toprak ve suda da bulunabilirler. İnsandan insana özellikle hastanede yatan hastalar arasında bulaş daha sık olmaktadır<sup>4,5</sup>.

Eskiden Friedlander pnömonisi adı verilen *Klebsiella*’ ların yaptığı pnömoni bakteriyel pnömonilerin %2’ sini kapsar. Daha çok 2 yaşından küçük ve 40 yaşından büyük kimselerde görülür. *Klebsiella pneumoniae*’ nin idrar yolu enfeksiyonları, piyelit, piyelonefrit ve sistit şeklinde ortaya çıkan bu tip enfeksiyonlar sağaltıma oldukça direnç göstermektedirler. Bunların dışında

otitis media, sinüzit, menenjit, prostatit, kolesistit, peritonit, daha az olmak üzere sepsis, karaciğer apsesi gibi birçok hastalığa ve yara enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar<sup>2</sup>.

*Klebsiella* cinsi bakterilerin önemli bir özelliği, katı besiyerinde büyük, mukoid koloniler yapmasıdır. Kanlı, serumlu besiyerlerinde kapsüllerini saklı tutarlar. En iyi glukozlu besiyerinde kapsül yaparlar. Pasajlarla ve özellikle safranlı besiyerlerinde kapsüllerini kaybederler. Deney hayvanlarında yeniden kapsül kazanırlar.

*Klebsiella* cinsi bakteriler, kuruluğa oldukça dirençli olup özellikle organik maddeler içinde kurutulursa aylarca canlı kalabilir. Isıya dayanıksızdırlar ve nemli ortamda 55°C'de ½ saatte ölürlür. Oda sıcaklığında tutulan kültürlerde haftalarca, +4°C'de aylarca canlı kalırlar. Kemoterapötik maddelere karşı oldukça direnç gösterirler. Hastane ortamından izole edilen kökenlerde dirençlilik düzeyi çok yüksek, üst solunum yollarından elde edilenlerde nispeten düşüktür<sup>1,2</sup>.

*Klebsiella* cinsi bakteriler genellikle MacConkey agar, Hektoen enteric agar, Xylose-lysine-deoxycholate agar ve %5 koyun kanlı agarda üremektedirler. MacConkey agar ve koyun kanlı agarda mukoid koloniler oluştururken, Hektoen enteric agar ve Xylose-lysine-deoxycholate agarda sarı renkte koloniler oluştururlar. Normal şartlar altında 24 saat inkübasyonda, sıvı ya da katı besiyerinde, oksijenli ortamda fark edilebilir görünümde üreme gerçekleştirirler<sup>4</sup>.

## II.1. *Klebsiella pneumoniae*' nin Özellikleri

### Biyokimyasal Özellikleri

*Klebsiella* cinsi bakterilerin türleri arasında biyokimyasal reaksiyonları bakımından çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak *Klebsiella* cinsi bakteriler, anaerob ve düşük oksijenli ortamda ürediklerinde, karbonhidratları fermente ederler. Fakat yeterli oksijen bulunduğu anda enerji sağlamak için trikarboksilik asit siklusunu ve elektron taşıma sistemini kullanırlar. Oksidaz negatiftir. *Klebsiella* cinsi bakteriler deoksiribonükleaz enzim aktivitesine sahip değildir. Nitratları nitritlere indirgeyebilirler, fakat alginatı eritmezler. Birçok şekeri fermente etmelerine rağmen türler arasında farklılıklar vardır. D-glukoz, laktoz ve sukrozu fermente etmelerinin yanında mannitol, adonitol, trehalozu da fermente ederler. Örneğin *Klebsiella rhinoscleromatis* laktozu fermente edemez <sup>1,6</sup>.

Glukoz fermentasyonunda butanediol fermentasyonu yolunu kullanırlar. Butanediol fermentasyonunda yan ürün olarak aseton oluşmaktadır. Bu nedenle *Klebsiella*' ların Voges-Proskauer reaksiyonu pozitifdir.

*Klebsiella* cinsi bakterilerin identifikasyonu için uzun zamandan beri IMVIC testi kullanılmaktadır. IMVIC testi; indol reaksiyonu (I), metil kırmızısı reaksiyonu (M), Voges-proskauer reaksiyonu (V) ve sitrat reaksiyonu (C) olmak üzere dört reaksiyondan oluşan bir testtir. *Klebsiella*' nın IMVIC testi (- - + +) dır.

*Klebsiella* cinsi bakteriler arasında biyokimyasal farklılıkların oluşu türlerin identifikasyonunda önemlidir. Bunun için indol oluşumu ve sitrat

kullanımına bakılarak da değerlendirilir. *Klebsiella ornithinolytic* ve, *Klebsiella oxytoca* indol pozitif iken, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella planticola* ve *Klebsiella terrigena* indol negatiftir. Sitrat testi, mikroorganizmanın metabolizması için karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını ortaya koyar. *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella planticola* ve *Klebsiella terrigena* sitrat pozitif, *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella rhinoscleromatis* ise sitrat negatif özellik taşımaktadır. Karbon kaynağı olarak malonatı da kullanırlar<sup>1,6</sup>.

*Klebsiella*' lar jelatini eritmez, üreyi yavaş hidrolize eder ve Christensen'in üre agarında parlak pembe renk oluştururlar. Potasyum siyanürlü besiyerinde ürerler. *Klebsiella* cinsi bakterilerden yalnızca *Klebsiella rhinoscleromatis*' de lizin dekarboksilaz enzimi yoktur ve bu nedenle lizini kadeverine dönüştüremez. Sadece *Klebsiella ozaenae* arjinin dihidrolaz enzimi ile ornitini putresine dönüştürebilme yeteneği *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella terrigena*' da gözlenir. *Klebsiella* cinsi bakteriler, H<sub>2</sub>S üretmezler, fenilalanini deamine etmezler. *Klebsiella pneumoniae*' de tip 1 fimbrialar bulunur<sup>1,2,6</sup>.

*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella rhinoscleromatis* laktozdan gaz oluştururlar. *Klebsiella* cinsi bakterilerin *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* cinsi bakterilerden ayırımında hareket yetenekleri ve DNAaz enzim aktiviteleri araştırılır. *Klebsiella*'lar hareketsiz, diğerleri hareketlidir<sup>2</sup>.

Optimal 3°C ve pH 7'de iyi ürerler. Aerob ve fakültatif anaerobtur. Sıvı besiyerlerinde homojen bir bulanıklık ve dipte mukoz bir çökelti yaparak üremektedirler. Üredikleri ortama bol kapsül maddesi salarlar. Katı besiyerlerindeki kolonileri, tipik mukoid nitelikte, büyük, sarımtırak gri renkte ve akıcı kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda S ve R kolonilerine dönüşebilirler. Yatık jelozdaki birikme sıvısı gri-beyaz mukoid bir kitle şeklini alır. Buyyonda birkaç günlük kültürlerde bir kıvamlaşma oluşarak besiyeri eritilmiş jelatin kıvamında bir görünüm alır<sup>2</sup>.

MacConkey agarda koloniler tipik olarak büyük, mukoid ve kırmızıdır. Agar çevresine diffüze olan kırmızı pigment laktoz fermentasyonunu ve asit üretimini gösterir<sup>4,6</sup>.

### **Antijen Yapıları**

*Klebsiella*'larda polisakkarit yapısındaki O ve K antijenleri bulunmakta olup bu bakterilerin serolojik tiplendirilmeleri bu antijenlere göre yapılır. Bu antijenlere karşı elde edilmiş antiserumlarını kullanarak lam ve tüp aglütinasyonu, kültür süzöntüsü ile presipitasyon ve Neufeld' in kapsül şişme reaksiyonu yöntemleri ile *Klebsiella*' lar tiplendirilebilir. *Klebsiella* enfeksiyonlarının epidemiyolojik yönden incelenmesinde tipe özgü K antiserumları yararlıdır.

### **Virulans Faktörleri**

*Klebsiella* cinsi bakterilerin geniş polisakkarit kapsülü, bakteri hücrelerini fagositozdan koruyan önemli bir virulans faktörüdür. Ayrıca enfekte bölgeye lökosit göçünü geciktirir. *Klebsiella*'larda kapsül ve

lipopolisakkaritlerde bulunan endotoksin dışında moleküler düzeyde herhangi bir virulans faktörü tanımlanmamıştır. *Klebsiella*'larda konak organizmadan demir iyonu sağlayabilen sideroforların varlığı gösterilmiştir. Sideroforlar yayılcı sistemik enfeksiyon oluşturulmasında esansiyel bir faktör olan demiri sağlamaktadır. Ayrıca 'adhezyon' denen yapışma yeteneği de virulans ile ilgilidir. Fimbrialar yapışmadan sorumlu en önemli yüzey adhezinleri ya da ligantlarıdır<sup>7, 8</sup>.

Çok kırılgan olan fimbrialar sürekli olarak kaybedilir ve yerlerine yenileri yapılır. Üst solunum yolu enfeksiyonuna yol açan bazı bakteriler, yeni fimbrialar yaparak konağın immün yanıtını engeller<sup>6</sup>.

#### **Etken Oldukları Klinik Tablolar**

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda %5–10 oranında *Klebsiella pneumoniae* bulunmaktadır. Nadir olarak normal kişilerin orofarinkslerinde taşıyıcı oranı %1–6 'dır. *Klebsiella pneumoniae* tipik lobar pnömonisini oluşturur. Fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilebilir. Çünkü *Klebsiella pneumoniae* solunum yolları savunma sistemi bozuk olan alkolik, diabetes mellitus, kronik tıkalı akciğer hastalığı olan kişilerde görülür. Bazı olgularda bronkopnömoni veya bronşit şeklinde gelişir. Abse oluşumu, ampiyem, plörezi oluşma ihtimali yüksektir. Bu hastalarda ölüm oranı da yüksektir<sup>1, 6</sup>.

*Klebsiella pneumoniae*' nin etken olduğu hastane enfeksiyonlarına üriner yol, alt solunum yolları, safra kesesi, cerrahi insizyon yeri gibi bölgelerde sıklıkla rastlanmaktadır. *Klebsiella*' ların diğer tipleri daha az oranda hastane

enfeksiyonu etkenidir. Yatan hastalarda kullanılan ürener kateter, endotrakeal tüp, damar içi kateter gibi invaziv araçlar özellikle gram negatif basillerle oluşan hastane enfeksiyonlarına yatkınlığı belirgin derecede arttırmaktadır<sup>1</sup>.

## **II. 2. Antibiyotiklere Direnç ve Direnç Mekanizmaları**

### **Antibiyotik Direnci**

Mikroorganizmalar üzerine mikrobisit (öldürücü) veya mikrobiyostatik (üremelerini durdurucu) etki gösteren bazı bakteri, *Actinomycetes* gibi mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelere antibiyotik denmektedir<sup>9</sup>.

Sir Alexander Fleming’ in 1929 yılında penisilini keşfetmesinden sonra penisilin Florey ve arkadaşlarının çalışmaları ile klinik kullanıma girmiş, böylece tıp dünyasında ‘Antibiyotik Dönemi’ başlamıştır. Penisilinle 1940’ lı yıllarda elde edilen başarı yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi konusundaki çalışmaları hızlandırmış ve kısa süre içerisinde yeni antibiyotikler kullanıma girmiştir<sup>10</sup>.

Bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olan direnç, ilk kez *Escherichia coli* suşunda penisilini parçalayan bir enzim varlığını gösteren Abraham ve Chain tarafından 1940 yılında bildirilmiştir. 1944 yılında Kirby, *Staphylococcus aureus* suşlarında benzer özelliklerde bir başka enzim elde etmiştir. Penisilin yaygın olarak kullanılmaya başlamadan önce hem Gram negatif hem de Gram pozitif mikroorganizmalarda penisiline karşı direnç saptanmıştır. Yine 1940’lı

yıllarda Gardner ve arkadaşları antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı bazı adalarda da toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğunu belirtmişlerdir. Bütün bunlar antibiyotik direncinin sadece yaygın antibiyotik kullanımının bir sonucu değil, bakterinin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğunu göstermektedir. Bunları izleyen yıllarda antibiyotik kullanımının etkileri görülmeye başlanmıştır. 1959 yılında Japonya’da *Shigella dysenteriae* suşlarında çoklu (multiple) antibiyotik direnci saptanmış ve direnç özelliği konjugasyon ile *Escherichia coli* suşlarına aktarılabilmektedir. 1960’ların sonu 1970’li yıllar arasında önce *Staphylococcus aureus* sonra da hastane salgınlarından soyutlanan Gram negatif basil türlerinde ilaç direnci saptanmıştır. Direnç sorunundaki artışa paralel olarak ilaç endüstrisi de geliştiği için tüm ajanlara dirençli mikroorganizmalar çıkmadan, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler (1980) ve florokinolonlar (1990) geliştirilmiş ve enfeksiyon sağaltımında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak günümüzde bu antibiyotiklere karşı da direnç geliştiği görülmektedir<sup>1, 11</sup>.

Tablo 1. Antibiyotik direnç gelişim süreci<sup>9</sup>

| Antibiyotik     | Üretildiği Yıl | Direncin Gözlenmesi |
|-----------------|----------------|---------------------|
| Sülfonamidler   | 1930           | 1940                |
| Penisilin       | 1943           | 1946                |
| Streptomisin    | 1943           | 1959                |
| Kloramfenikol   | 1947           | 1959                |
| Tetrasiklin     | 1948           | 1953                |
| Eritromisin     | 1952           | 1988                |
| Vankomisin      | 1956           | 1988                |
| Metisilin       | 1960           | 1961                |
| Ampisilin       | 1961           | 1973                |
| Sefalosporinler | 1960           | 1960                |

Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmıştır. Antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların sağaltımında büyük sorunlar yaşanmaya başlamıştır. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek büyümektedir<sup>11</sup>.

### **Direnç Tipleri**

Bakteriler antibiyotiklere karşı üç tip direnç gösterir.

## 1. Doğal (İntrensek) Direnç

Bakteriler, antibiyotiklere doğal olarak dirençli olabilir. Bu tür direnç bakterinin temel özelliğidir ve antibiyotiğin kullanımı ile ilişkisi yoktur, kalıtsal değildir. Doğal direnç, bu mikroorganizmaların tür özelliği olarak antibiyotiğin hedefi olan yapıyı taşımamalarının veya antibiyotiğin yapısal bir özelliğinden dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Örneğin antibiyotiğin dış membrandan geçememesi nedeni ile Gram (-) bakteriler vankomisine doğal olarak dirençlidir. Bakterilerin L formları ve *Mycoplasma*'lar gibi çepersiz mikroorganizmalar penisilin gibi hücre duvar sentezi inhibitörlerine doğal dirençlidir. Aynı şekilde metabolik olarak inaktif olan bakteri sporları doğal dirençlidir. Çünkü birçok antibiyotiğin etkili olabilmesi için bakterilerin aktif üreme döneminde olması gereklidir.

## 2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç

Antimikrobiyal ajanın in-vivo ve in-vitro etkinliği arasındaki farkı gösteren bir tanımdır. Laboratuvarda mikroorganizmaya etkili olarak değerlendirilen antimikrobiyal ajan; dokudaki oksijen basıncı ve pH değişiklikleri veya enfeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi nedenlerle in-vivo olarak etki göstermeyebilir. Örneğin birinci kuşak sefalosporinler kan-beyin bariyerini geçemedikleri için etken mikroorganizmaya etkili bulunsalar da menenjit tedavisinde kullanılamaz. Benzer şekilde düşük pH veya anaerobik koşullar antibiyotiklerin in-vivo etkinliklerini kısıtlamaktadır.

### 3. Kazanılmış Direnç

Bir bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajandan etkilenmeyebilir. Bu durumda o bakteri direnç kazanmış olur. Genetik kaynaklı direnç kromozomal ya da kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir. Antibiyotik sağaltımı sırasında kromozomal mutasyonların oluşması dirençli patojenlerin gelişebilmesinde veya direnç genlerinin aktarılmasında önemlidir.

Direnç genlerinin doğada antimikrobiyal tedavi ile ilişkili olmaksızın da bulunduğu gösterilmiştir. Bunların varlığı olasılıkla, *Actinomycetes*' ler gibi saprofit mikroorganizmaların ürettiği doğal antibakteriyel bileşikler ile ilgilidir. Bu doğal bileşikler günümüzde klinik sağaltımda kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu mikroorganizmaların kendilerini ürettikleri antibakteriyellerden korumaları gereklidir. Kromozomal direnç genlerinin yanı sıra direnç plazmidleri de *Actinomycetes* sınıfında son derece yaygındır. Bu nedenlerle toprak ve doğal çevre, antibiyotik direnç genleri açısından büyük bir depo görevini görmektedir. Bunların yanı sıra, antibiyotiklerin üretiminin tıp alanına girmesinin ve örneğin hayvancılıkta sağaltım dışı kullanımının da direnç genleri taşıyan klonların oluşmasına neden olduğu kesindir.

Yaygın antibiyotik uygulanması sonucunda dirençli bakteriler, önce sağlıklı hayvanların floralarında çoğalmakta sonra da su ve besin zinciri yoluyla insanlara aktarılmaktadır. Sağlıklı bireylerde dirençli bir bakterinin

taşınması önemsiz gibi gözükmekle birlikte enfeksiyon oluştuğunda ciddi sorun yaratabilmektedir<sup>1</sup>.

Hastane ortamı antibiyotiklerin seçici baskısı Gram negatif basillerin çoğalması için son derece uygundur. Çok sayıda antibiyotiğe dirençli olabilen bu mikroorganizmalar, hem aşırı antibiyotik uygulanması hem de hastaların durumu nedeniyle, özellikle yoğun bakım ünitelerinde sağlık personeli veya solunum cihazları ile taşınarak hastalar arasında yayılmaktadır. Bunun yanı sıra antibiyotiklerin gereksiz yere ve uygun olmayan dozlarda kullanımı da dirençli klonların oluşmasında etkilidir<sup>1</sup>.

### **Bakterilerde Kromozomal Direnç Mekanizmaları**

Bakteri kromozomunda kendiliğinden (spontan) oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Spontan mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerle oluşabilir. Sonuçta bakteri hücresinde yapısal değişimlere neden olur. Böylece hücrenin ilaca permeabilitesi azalabilir veya hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olabilir. Spontan kromozomal mutasyon oranı  $10^{-7} - 10^{-12}$  dir. O nedenle klinikte bu tip direnç azdır ve nadiren sorun yaratır.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri kromozomal direnç mekanizmaları dört şekilde gelişmektedir.

#### **1. Metabolik Yolun Değiştirilmesi**

Sulfonamidlere direnç, antibiyotiğin folik asit sentezi yapan enzime bağlanamaması sonucu gelişmektedir. Çünkü enzimin yapısı değişmiştir. Antibiyotik direnci, mikroorganizmada normalde antibiyotiği inhibe eden yol yerine, değişik bir metabolik yol kullanılmasına bağlı olabilmektedir.

## **2. Antibiyotik İnaktivasyonu**

Direnç, mikroorganizmanın antibiyotiği enzimle inaktive edebilmesinden ortaya çıkabilir. Örneğin; hücre duvar sentezini engelleyen  $\beta$ -laktam ajanlara karşı ürettikleri  $\beta$ -laktamaz enzimiyle direnç geliştirebilir.

## **3. Hücreye Giren İlaç Miktarının Azalması**

Bakterinin ilaca geçirgenliğinin azaltılması şeklinde oluşur. Örneğin penisiline dirençli *Pseudomonas* membran geçirgenliğini değiştirerek antibiyotiğin sitoplazmaya geçişini engeller.

## **4. Hedef Değişikliği**

Mikroorganizmalar ribozomal hedef yerinde değişiklik, hücre duvarı prokürsörlerinde değişiklik ve hedef enzim değişikliği yaparak direnç kazanırlar. Örneğin bazı streptomisin dirençli bakteriler ribozom yapılarını değiştirerek o antibiyotiğin ribozoma bağlanmasını engeller ve protein sentezi inhibe edilmemiş olur<sup>12,13</sup>.

## **Bakterilerde Ekstrakromozomal Direnç Mekanizmaları**

Çeşitli yollarla aktarılan plazmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elemanlara bağlıdır.

Plazmidler, bakterilerde antibiyotik uygulamasından önce de var olan ve kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır. R (rezistans) faktörleri bir ya da birkaç antimikrobiyal ilaca ve ağır metallere karşı direnç genlerini taşıyan plazmidlerdir. Plazmid genleri, genellikle ilaçları parçalayan enzimlerin üretilmesinden sorumludurlar.

Transpozonlar ise bakteri kromozomunun değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmidden plazmide, plazmidden DNA veya bakteriyofaja aktarılabilen; kendi kendine replike olamayan, o nedenle kromozom, plazmid veya bakteriyofaj gibi bir replikon üzerinde bulunan DNA dizileridir. Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler bir bakteriden diğetine transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon gibi mekanizmalarla aktarılırlar.

Kromozom veya plazmid üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile yavru hücrelere aktarılır (vertikal geçiş). Bu yeni hücrelerin çoğalması ile de dirençli suşların ve direnç genlerinin yayılımı gerçekleşir (klonal yayılım). Plazmidler konjugasyon ile de yatay olarak aktarılabilir.

Konjugasyon; iki bakteri hücresinin teması sonucunda genetik eleman aktarımıdır ve türler arası plazmid aktarımının in-vivo koşullarda da oluşabilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca direnç plazmidleri Gram (+) ve Gram (-) bakteri türleri arasında da aktarılabiliirler. Direnç genlerinin yeni konaklara aktarımında tek mekanizma plazmid transferi değildir.

Transpozisyon ile transpozon veya transposable elementler diye bilinen kısa DNA sekansları aktarılabilir. Özellikle Gram (+) bakterilerde bulunan konjugatif transpozonlar, plazmid olmaksızın gen aktarımını sağlayabilir. Son yıllarda direnç genlerinin özellikle transpozonlarca taşındıkları anlaşılmıştır. Bir diğeri önemli nokta ise bu tip aktarım olaylarının düşük yoğunluklu antibiyotik varlığında hızlanmasıdır.

Transformasyon, ortamda serbest bulunan DNA'nın bakteri hücresi içine alınması olup bu şekilde de direnç genleri aktarılabilir. *Neisseria* türleri ve streptokoklarda patojen ve nonpatojen türler arasında gen aktarımı sonucu penisilin bağlayan protein (PBP) değişimlerinin transformasyon ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

Transdüksiyon, direnç genlerinin bakteriyofaj aracılığı ile transferi olup, sıklıkla laboratuvar koşullarında direnç aktarımı için uygulanır.

Kromozom veya plazmid üzerindeki antibiyotik direnç genlerinin birbiri ile bağlantılı olduğu ve başlangıç bölgesinin yakınında özel integrasyon birimleri bulunduğu gözlenmiştir. Bunlara integron denir. İntegronlar rekombinasyonun çok sık görüldüğü sıcak noktaları oluştururlar.

Belli bir ilaca karşı dirençli olan bazı mikroorganizmaların, aynı veya benzer mekanizma ile etki eden diğer ilaçlara karşı da dirençli olması çapraz direnci meydana getirir. Bu durum genellikle yapıları benzer ilaçlar (eritromisin-oleandomisin, neomisin-kanamisin gibi.) arasında gözlenmektedir. Ancak bazen tümüyle ilgisiz ilaçlar arasında görülebilir. Eritromisin-linkomisin arasındaki çapraz direnç buna örnek olarak verilebilir. Kromozomal veya ekstrakromozomal orijinli olabilir<sup>11</sup>.

### **Antibiyotik Direncinin Klinik Önemi**

Hastanede gelişen veya sağlık hizmetlerine bağlı enfeksiyonlardaki sorunlarla birlikte antibiyotik direnç sorunu da oldukça önem taşımaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 2 milyon hastada hastane enfeksiyonu gelişmekte, bunların 90 bini enfeksiyona bağlı nedenlerle ölmektedirler. Hastane

enfeksiyonları etkenlerinin %70' den fazlası en az bir antibiyotiğe dirençli bulunmaktadır. Bu hastalarda mortalitenin yanı sıra hastanede yatış süresi uzamakta, kullanılan ikinci veya üçüncü seçenek ilaçlara bağlı olarak yan etkilerde artış görülmekte ve tedavi maliyeti yükselmektedir <sup>14</sup>.

Antibiyotiklere direnç gelişmesinde en önemli neden antibiyotik kullanımıdır. Bu yüzden antibiyotik direncini önleme önerilerinin başında antibiyotik kullanımının akılcı hale getirilmesi gelmektedir. Bunun için ulusal ve uluslar arası bazı kuruluşlar hazırladıkları raporlarda birtakım önerilerde bulunmuşlardır. Bu öneriler ana hatları ile şu başlıklar altında toplanmaktadırlar:

1. Hasta, hasta yakını ve topluma yönelik aktiviteler,
2. Antibiyotik tedavisi uygulayanlara yönelik aktiviteler,
3. Hastanelerde uygulanması önerilen işlemler,
4. Hayvanlarda antibiyotik kullanımı ile ilgili önlemler,
5. Ulusal programların geliştirilmesi önerileri,
6. Yeni antimikrobiyal araştırmaları ile ilgili öneriler,
7. Antibiyotik direncini önlemede uluslar arası işbirliği önerileri <sup>10</sup>.

Bazı kurumlar raporlarda belirtilen önerileri kullanmış ve bazı stratejiler geliştirerek yeni programlar hazırlamışlardır. Bu stratejiler ise kısaca;

1. Enfeksiyonun önlenmesi,
2. Enfeksiyonun etkin bir şekilde tanısının konması ve tedavisi,
3. Antimikrobiyallerin akılcı kullanımı,
4. Dirençli patojenlerin yayılımının önlenmesidir.

Hastanelerde antibiyotik direncini önlemeye yönelik takip edilen yöntemler başarılı olmuştur<sup>10</sup>.

### **II. 3. Hastane Enfeksiyonları**

Hastaneye yatış sırasında inkübasyon döneminde olmayan, yatıştan sonra hastanede veya taburcu olduktan sonra gelişen enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlar “Nozokomiyal Enfeksiyonlar” olarak ta bilinmektedir. Hastane enfeksiyonları genellikle hasta hastaneye yattıktan 48–72 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki 10 gün içinde gelişir. Yapılan çalışmalar, yatan hastaların %3-14' ünde hastane enfeksiyonu geliştiğini göstermiştir. En gelişmiş ülkelerde bile oran %4 dür. Hastane enfeksiyonları endemik ve epidemik olmak üzere iki ana grupta incelenebilir.

Epidemik Hastane Enfeksiyonları: Hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %4' ünü oluşturmalarına rağmen, yüksek mortaliteye yol açmaları nedeniyle önemli olan enfeksiyonlardır. Epidemilerin büyük kısmı yoğun bakım ünitelerinde hayatı tehdit eden enfeksiyonlar şeklinde görülür. Yoğun bakım ünitelerinde bu enfeksiyonların sık görülmesi, invazif girişimlerden, immün sistemin zayıflamasından ve kişilerden kişilere transferin kolay olmasından kaynaklanmaktadır.

Endemik Hastane Enfeksiyonları: Sporadik olarak gözlenen enfeksiyonlardır.

Görülme sıklığına göre hastane enfeksiyonları

1. Üriner Sistem Enfeksiyonları,
2. Pnömoni,

3. Cerrahi Yara Enfeksiyonları,
4. Bakteriyemiler olmak üzere dört gruba ayrılır.

### **Üriner Sistem Hastane Enfeksiyonları**

Üriner sistem enfeksiyonları en sık rastlanan enfeksiyonlardır. Enfeksiyonların yaklaşık %40-%60' ını oluşturur. Bu enfeksiyonların %85' inden kateter uygulamaları, % 15' inden sistoskopi, sistostomi takılması, perkütan nefrostomi ve prostat iğne biyopsileri vb. girişimleri sorumludur. Kısa süreli kateterizasyon sırasında sıklıkla tek bir ajana bağlı enfeksiyon gelişmekte, ancak uzun süreli kateterizasyon sırasında ise birden fazla ajan enfeksiyona neden olmaktadır. Bu mikroorganizmaların en başta geleni, *E .coli*' dir. Yapılan laboratuvar incelemesinde kateter takılı olan hastalarda 102 koloni/ml üreme, üriner sistem enfeksiyonları için anlamlı bir sonuçtur<sup>10, 15</sup>.

### **Hastane Kökenli Pnömoniler**

Hastane kökenli pnömoniler, hastaneye kabulden 48 saat sonra veya hastaneden taburcu olduktan sonra 48 saat içerisinde gelişen akciğer parankiminin enfeksiyonu olarak bilinir. Hastane enfeksiyonları içinde en yüksek mortalite ( %33–50) ve morbiditesi olan enfeksiyondur. Büyük otopsi çalışmalarında ölümlerin %7,5' inin nozokomiyal pnömonilerden olduğu bildirilmiştir. Mekanik ventilatörlerin uygulanmadığı hastalarda mortalite %30 civarındadır. Yüksek riskli mikroorganizmalar (enterik gram-negatif basiller, mantarlar), bilateral radyografik infiltratlar ve solunum yetmezliği mortaliteyi belirleyen en önemli faktörlerdir. Entübe edilen hastalarda böbrek yetmezliği olması, uzun süreli mekanik ventilasyon, koma, başvuruda pnömoni olması,

uygunsuz antibiyotik kullanımı, şok, solunum yetmezliğinin şiddetlenmesi önemli prognostik faktörlerdir <sup>14,16</sup>.

Özellikle yoğun bakım ünitelerinin bulunduğu merkezlerdeki hastane enfeksiyonları içinde ikinci sırada görülür. Bunun yanında hastanede kalış süresinin uzaması ve hastane maliyetinin artması yönleri ile de nozokomiyal enfeksiyonlar içinde ayrı bir öneme sahiptir. Yatıştan ilk 4 gün içinde gelişen pnömonilere erken, daha sonraki günlerde ortaya çıkanlara ise geç pnömoniler denilmektedir <sup>15, 17</sup>.

Hastane kökenli pnömonilerin gelişebilmesi için, konak savunma sisteminin bozulması, alt solunum yollarına yeterli miktarda virülen mikroorganizmanın ulaşması gerekmektedir. Konak hastaneye yatışının 48. saatinden itibaren hastane florasının mikroorganizmaları ile kolonizasyona maruz kalır. Kolonizasyonda rol alan mikroorganizmaların kaynakları; çevre, tıbbi araç ve gereçler, diğer hastalar ve sağlık çalışanlarıdır <sup>16</sup>.

Hastane kökenli pnömoni tanısı en güç konulabilen enfeksiyonlardandır. Klinik olarak tanımı 4 ölçüt temelinde yapılmaktadır. Bu ölçütler:

1. Yeni ortaya çıkmış veya ilerleme gösteren radyolojik pulmoner infiltrasyon,
2. Ateş,
3. Lökositoz,
4. Trakeobronşiyal pürülan sekresyondur.

Bu ölçütler, balgamin Gram boyasında mikroskobun her alanında 10' dan az yassı epitel ve 25' den fazla polimorfonükleer lökosit olması, kültürle etkenin üretilmesiyle kuvvetlendirilebilir.

Tedavi ve Korunma: Nozokomiyal pnömonilerde uygun antibiyotiğin erken başlanması esastır. Tedavi genellikle olası etkenlere yönelik olup ampiriktir. Tedavi planlanmasında pnömoninin ciddiyeti, özel bir mikroorganizmayı düşündüren risk faktörleri ve pnömoninin başlama zamanı gibi ölçütlerin mutlaka dikkate alınması gerekir. Nozokomiyal pnömoni profilaksisinin ihmal edilmemesi, etkin ve tedaviden daha ekonomik bir yol olması nedeniyle benimsenmelidir <sup>15, 17</sup>.

### **Cerrahi Alan Enfeksiyonları**

Sıralamada 3. sıradadır. Tüm Hastane Enfeksiyonlarının %15 ini, ortaya çıkan tüm cerrahi enfeksiyonların %38 ini oluştururlar. Bu enfeksiyonlar genellikle cerrahi işlemden önce, cerrahi işlem sırasında ve cerrahi girişimden bir ay sonra ortaya çıkan enfeksiyonlardır. Bazen bu süre bir yıla kadar uzayabilir. Cerrahi Alan Enfeksiyonları; cilt ve cilt altını tutan yüzeysel enfeksiyonlar, fasya ve kasları tutan derin enfeksiyonları ve organ boşluğu enfeksiyonları olmak üzere üç grupta toplanmaktadır <sup>14</sup>.

### **Bakteriyemiler**

Hastane enfeksiyonları arasında önemli oranda yer alan ciddi bir sorundur. Yoğun bakım ünitelerinde bu enfeksiyon riski yapılan girişimlere bağlı olarak diğer birimlerden daha fazladır. Primer ve sekonder bakteriyemi olarak iki grupta toplanır. Primer bakteriyemiler doğrudan doğruya takılan

kateter ile ilgilidir ve %80 oranındadır. Mikroorganizmaların deriden doğrudan damar içine geçmesi kateterler aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca kontamine olan sıvının verilmesi diğer bir bakteriyemi sebebidir. En önemli etken %60 oranında stafilokoklardır. Kateterin, tipi, takıldığı yer, takılış şekli ve bakımı enfeksiyon da etkili olan unsurlardır<sup>14, 15</sup>.

#### **II.4. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL) ve Genel Özellikleri**

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, mikrobiyolojik olarak oksiminio sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanabilmektedir<sup>18</sup>.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten türler 1980' lerin başında tanımlanmıştır. Bugüne kadar geçen süre içerisinde de genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminde artış görülmüştür<sup>19</sup>.

GSBL' ler kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL de mevcuttur<sup>20</sup>.

Çoğu GSBL, enterik Gram negatif bakterilerin plazmid, kromozomal veya integronlarda olan TEM-1, TEM-2 VE SHV-1' den köken alır. Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki amino asitlerden bir ile dördünün yerine farklı amino asitlerin gelmesi sonucu GSBL' ler oluşur. Enzimin yapısında meydana gelen bu değişiklik, enzim-substrat ilişkisinin sağlandığı aktif bölgede yeni bir modellenmeye yol açarak geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama karşı direnç oluşturmaktadır. Yapısal özellikler ve evölüsyon açısından GSBL' ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, GES/IBC, TLA, BES VE OXA' dır. GSBL'

lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerirler ve Ambler' in moleküler sınıflamasına göre A sınıfında yer alır. Beta laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasına göre ise GSBL' ler 2be, 2e ve 2d alt gruplarına sokulmaktadır <sup>20</sup>.

GSBL' ler oksimin, sefalosporinler ve aztreonamın yanı sıra birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil penisilinleri de hidrolize uğrattır. Ancak bu enzimlerin sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin ve sefotan) karşı etkileri yoktur. Sefamisinlere etkili olmamaları, GSBL' leri AmpC tipi beta-laktamazlardan ayıran en önemli karakteristik özellikleridir<sup>18, 21</sup>.

### **Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların (GSBL) İsimlendirilmesi**

Beta laktamazların isimlendirilmesi düzenli bir terminoloji şeklinde değildir. Enzimler, kullandıkları substrata (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine (SHV, NBC), genlerine (AmpC, CepA), bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hastalara (TEM, ROB), bulundukları hastaneye (MIR, RHH), bulundukları şehirlere (OHIO) ve bazıları da bulan kişilere göre (HMS) isimlendirilmiştir<sup>22</sup>.

### **Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların (GSBL) Klinikte Yaratdığı Sorunlar**

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problemi gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezlediği

saptanan Gram negatif bakteri tüm genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli kabul edilmelidir<sup>18</sup>.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sentezleyen bakterilerde kolonizasyon riskini artıran risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar; yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalma, huzurevinde kalma, geniş spektrumlu antibiyotik kullanma, altta yatan başka hastalıklar, invaziv işlemlere maruz kalma, ventilatör kullanılması, intravasküler kateter kullanımı, abdominal cerrahi, düşük doğum tartısı olarak sayılabilir<sup>20, 23, 24, 25</sup>.

GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi gözükabilir. Ancak bu bakterinin neden olduğu hastalık eğer üriner sistem enfeksiyonu dışında bir enfeksiyonsa 3. kuşak sefalosporin tedavisi başarısızlıkla sonuçlanacaktır<sup>26</sup>. TEM-26 taşıyan bir *Klebsiella pneumoniae* suşu in-vitro seftazidime dirençli (MIC>257 mcg/ml), sefotaksime ise duyarlı (MIC 0,5 mcg/ml) görünse bile eğer bu bakterinin neden olduğu bakteriyeminin tedavisinde sefotaksim kullanılacak olursa klinik başarısızlık olacaktır<sup>25</sup>. Bunun nedeni TEM-26'nın düşük yoğunluklarda bile seftazidime yüksek affinite göstermesi, buna karşın sefotaksime hidrolitik aktivitesinin ancak enfeksiyon ortamında olduğu üzere bakteri yoğunluğunun arttığı durumlarda ortaya çıkmasıdır. İnokulum etkisi adı verilen bu etki, bakteri yoğunluğunun arttığı durumlarda GSBL' nin in-vitro koşullarda kullanılan yoğunluklarda hidrolize edemediği beta-laktamları inaktive etmesi şeklinde açıklanmaktadır<sup>20</sup>.

GSBL varlığı morbidite ve mortaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir.

### **Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Taşıyan Bakterilerin Neden Olduğu Enfeksiyonların Tedavisi**

Günümüzde GSBL sentezleyen Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en fazla tercih edilen antibiyotiklerin başında karbapenem türevleri gelmektedir<sup>18</sup>. Karbapenem türevleri sadece plazmid aracılığıyla sentezlenen GSBL veya GSBL dışı enzimlere değil, aynı zamanda kromozomlar aracılığıyla sentezlenen beta-laktamazlara karşı da etkilidir. Ancak karbapenemlerin yaygın kullanımına ilişkin sakıncaları da mevcuttur. Bunlar arasında metallo-karbapenemaz sentezleyen mikroorganizmalar (*Stenotrophomonas maltophilia* gibi), kromozom aracılığıyla sentezlenen serin proteazların yaygınlaşmaya başlaması ve *Klebsiella pneumoniae*' de porin mutasyonu sonucu gelişen karbapenem direnci sayılabilir<sup>20</sup>.

Bir dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim özellikle SHV kökenli GSBL' lere dirençlidir. Ancak bu antibiyotik de artan beta laktamaz yoğunluğu karşısında inokulum etkisine maruz kalarak inaktive edilmektedir. Ayrıca sefepim kullanımındaki artışın GSBL üreten bakterilerle salgına neden olabileceği de gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı sefepimin GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde öncelikle kullanılmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Eğer kullanılacaksa yüksek dozlarda ve mümkünse etkili olabilecek diğer antibiyotiklerle (kinolon ya da aminoglikozidler) birlikte kullanılmalıdır<sup>24</sup>.

### **Beta Laktamazların Sınıflandırılmaları**

Abraham ve Chain' in 1940 yılında bildirdikleri penisilinaz ile birlikte beta-laktamazların ilk sınıflandırmasını yapmışlardır. Bundan sonra yapılan ve kabul gören ilk sınıflandırma, Sawai ve arkadaşlarının yaptığı sınıflandırma olmuştur. Sawai, 1968 yılında enzimleri penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayırmış. Richmond ve Sykes ise 1973 yılında yaptıkları sınıflandırmada o güne değin bilinen tüm Gram negatif bakteri beta-laktamazlarını substrat profillerine göre 5 grupta toplamışlardır. Daha sonra Matthew özgül beta-laktamazların izoelektrik odaklama (İEF) ile tanımlanacağını göstermiştir. 1976'da bu şema Sykes ve Matthew tarafından tekrar düzenlenmiştir. 1981'de Mitsuhashi ve Inowe' nin yaptığı sınıflamada sefuroksimi hidroliz eden beta-laktamazlar kategorisi de eklenmiştir. 1989'da Bush tarafından önerilen gruplamada tüm bakterilerin beta-laktamazları yer almış ve ilk kez substrat ve inhibitör özellikleri moleküler yapı ile ilişkilendirilmiştir<sup>27</sup>.

1980'de Ambler beta-laktamazları moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayırmıştır<sup>28</sup>. Ambler sınıflamasına göre;

**Sınıf A:** Aktif bölgelerinde serin amino asit taşıyan, öncelikle penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır. Gram negatif bakterilerde en sık bulunan TEM–1 enzimi bu gruba iyi bir örnektir.

**Sınıf B:** Aktive gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metalloenzimlerdir.

**Sınıf C:** Aktif bölgelerinde serin amino asit taşıyan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan enzimlerdir.

**Sınıf D:** Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması, 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta-laktamazları 4 gruba ayırdıkları sınıflandırmadır. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırılmasına göre;

**Grup 1:** Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Moleküler sınıflamada sınıf C’de yer alırlar. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta-laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşın aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Karbapeneme karşı da duyarlıdırlar. Grup 1 enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve *Enterobacteriaceae* arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir.

**Grup 2:** En geniş kategoriyi oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküller sınıf olarak A ve D’ de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar<sup>27</sup>. Bu sınıflandırmaya göre oksiiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın

kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 amino asit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM- ve SHV- enzimleri gelişmiştir<sup>13</sup>. Bunlar grup 2be’de yer almakta ve GSBL (genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar = Extended-spectrum beta-lactamase) olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türk izolatlarında saptanmıştır<sup>24</sup>.

2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar<sup>29</sup>.

**Grup 3:** Bu grup, moleküler sınıf B’ de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. Monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta-laktamları hidroliz edebilirler. Klavulanik asit veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmaz, EDTA ile inhibe olurlar. Aktiviteleri için Zn (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu beta-laktamazlar a,b,c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar.

**Grup 4:** Bu grup, klavulanik asit ile pek de iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan oluşur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve moleköl sınıfı henüz belirlenmemiştir. *A. faecalis*, *B. fragilis*, *C. jejuni*’ den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*’ un indüklenebilen enzimi, *E. coli*’ nin plazmid

kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazu bu gruba sokulmuştur. *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar da bu gruba dahildir.

Tüm bu 4 grup beta-laktamaz, fonksiyonlarındaki çeşitliliği sergiler. Tek bir bakteride birden çok beta-laktamaz tipi aynı anda görülebilir ve bu çok sık olan bir durumdur. Böylece kromozomal ve plazmid kökenli beta-laktamazlar bazen iç içe geçerler. Hastane enfeksiyonlarında en sık sorun olarak karşılaşılan enzimler, Grup 1'deki kromozomal beta-laktamazlar, Grup 2'deki GSBL enzimler ve Grup 3'deki beta-laktamazlardır<sup>30</sup>.

Beta laktamazlarla bugüne kadar yapılan sınırlandırmalar aşağıda tablo 2' de açıklanmıştır.

Tablo 2. Beta-Laktamaz Sınıflandırılması<sup>28</sup>

| Bush<br>Jacobs<br>Medeiros | 1989<br>Bush<br>Grubu | Richmond<br>Sykes              | Mitsuhashi<br>sınıfı <sup>a</sup> | Molekül<br>sınıfı | Tercih edilen<br>substrat                                                        | Ca <sup>b</sup> | EDTA | Enzimler                                                                                       |
|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                          | 1                     | Ia, Ib, Id                     | CSase                             | C                 | Sefalosporinler                                                                  | -               | -    | Gram(-) bakterilerin AmpC;<br>MIR-1                                                            |
| 2a                         | 2a                    | Yok                            | PCase V                           | A                 | Penisilinler                                                                     | +               | -    | Gram(+) bakterilerin<br>penisilinazları                                                        |
| 2b                         | 2b                    | III                            | PCase I                           | A                 | Penisilinler,<br>Sefalosporinler                                                 | +               | -    | TEM-1, TEM-2, SHV-1                                                                            |
| 2be                        | 2b'                   | Yok,<br>(sadece IV<br>deki K1) | CXase                             | A                 | Penisilinler, dar<br>ve geniş<br>Spektrumlu<br>sefalosporinler,<br>monobaktamlar | +               | -    | TEM-3 ile TEM-26, SHV-2 ile<br>SHV-6, <i>K.oxytoca</i> K1                                      |
| 2br                        | Yok                   | Yok                            | Yok                               | A                 | Penisilinler                                                                     | ±               | -    | TEM-30 ile TEM-36, TRC-1                                                                       |
| 2c                         | 2c                    | II, V                          | PCase IV                          | A                 | Penisilinler,<br>Karbonilisilin                                                  | +               | -    | PSE-1, PSE-3, PSE-4                                                                            |
| 2d                         | 2d                    | V                              | PCase II<br>PCase III             | D                 | Penisilinler,<br>Kloksasilin                                                     |                 |      | OXA-1 ile OXA-11, PSE-2<br>(OXA-10)                                                            |
| 2e                         | 2e                    | Ic                             | CXase                             | A                 | Sefalosporinler                                                                  | +               | -    | <i>Proteus vulgaris</i> ' in<br>indüklenebilir sefalosporinazları                              |
| 2f                         | Yok                   | Yok                            | Yok                               | A                 | Penisilinler,<br>Sefalosporinler,<br>Karbapenemler                               | +               | -    | <i>E.cloacae</i> 'nin NMC-A' sı,<br><i>Serratia marcescens</i> ' in Sme-1'i                    |
| 3                          | 3                     | Yok                            | Yok                               | B                 | Birçok β-laktam,<br>karbapenemler<br>dahil                                       | -               | -    | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> '<br>nın L1'i <i>Bacteroides fragilis</i> ' in<br>Ccra' sı |
| 4                          | 4                     | Yok                            | Yok                               | NDC               | Penisilinler                                                                     | +               | -    | <i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın<br>penisilinazı                                                |

a: CSase sefalosporinaz, PCase penisilinaz, CXase sefuroksimi hidrolize eden β-laktamaz

b: CA Klavulonik asit

c: ND belirlenmemiş.

### SHV Tipi Beta Laktamazlar

SHV ‘sulfhydryl variable’ kelimelerinden türetilmiştir <sup>24,31</sup>. SHV tipi  $\beta$ -laktamazlar diğer GSBL tiplerine göre klinik izolatlarda daha fazla bulunmaktadır ve dünyada değişik bölgelerden köken alıp diğer ülkelere kolaylıkla yayılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. SHV  $\beta$ -Laktamaz Ailesinin Coğrafik Dağılımı <sup>32</sup>

| Beta-Laktamaz  | Başlangıç Ülke | Yıl  | Görüldüğü Diğer Ülkeler                                                                                     |
|----------------|----------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SHV- 1 (PIT-2) | İsviçre        | 1974 |                                                                                                             |
| SHV-2          | Almanya        | 1983 | Çin, Danimarka, Fransa, İspanya, Güney Afrika, İsviçre, Tunus, İngiltere                                    |
| SHV-2a         | Almanya        | 1986 | Kore, İsviçre                                                                                               |
| SHV-3          | Fransa         | 1986 | İngiltere, ABD                                                                                              |
| SHV-4          | Fransa         | 1987 | Belçika, Portekiz, İngiltere, ABD                                                                           |
| SHV-5          | Şili           | 1987 | Avusturalya, Avusturya, Danimarka, Mısır, Fransa, Yunanistan, İtalya, Polonya, Güney Afrika, İngiltere, ABD |
| SHV-6          | Fransa         | 1991 |                                                                                                             |
| SHV-7          | ABD            | 1993 |                                                                                                             |
| SHV-8          | ABD            | 1990 |                                                                                                             |
| SHV-9          | Yunanistan     | 1996 |                                                                                                             |
| SHV-10         | Yunanistan     | 1997 |                                                                                                             |
| SHV-11         | İsviçre        | 1997 |                                                                                                             |
| SHV-12         | İsviçre        | 1997 | Cezayir, Kore                                                                                               |

GSBL sentezleyen bakteriler dünyanın değişik ülkelerinde hastaneye yatan hastalarda farklı sıklıkta sorun olarak ortaya çıkabilmektedir.

GSBL oranı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye değişiklik gösterebilir. Yapılan çalışmalarda GSBL sıklığı Avrupa ülkelerinden; Fransa’ da % 40’ ın üzerindeyken Hollanda’ da %1’ den düşük, Latin Amerika ülkelerinde %42,7, Kuzey Amerika’ da %5,8 ve Asya’ da yaklaşık %18,6 olduğu belirtilmiştir<sup>31, 33</sup>.

SHV en sık *Klebsiella pneumoniae*’ de bulunur. SHV tiplerinin oluşmasında çeşitli mutasyonlar rol oynamaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. SHV  $\beta$ -Laktamazların Amino Asit Değişiklikleri<sup>34</sup>

|              |                    | Amino Asit Pozisyonları |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------|--------------------|-------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| β-Laktamaz   | Alternatif<br>İsim | 8                       | 20 | 35 | 43 | 54 | 116 | 130 | 140 | 141 | 179 | 192 | 193 | 205 | 238 | 240 |
| SHV-1 Dizisi |                    | I                       | L  | L  | R  | G  | G   | S   | A   | T   | D   | K   | L   | R   | G   | E   |
| SHV- 1       |                    |                         |    |    |    |    | A   |     | T   | A   |     | N   | V+G |     |     |     |
| SHV-2        |                    |                         |    |    |    |    |     |     | T   | A   |     |     |     |     | S   |     |
| SHV-2a       |                    |                         |    | Q  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | S   |     |
| SHV-3        |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     | L   | S   |     |
| SHV-4        |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     | L   | S   | K   |
| SHV-5        |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | S   | K   |
| SHV-6        |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     | A   |     |     |     |     |     |
| SHV-7        |                    | F                       |    |    | S  |    |     |     |     |     |     |     |     |     | S   | K   |
| SHV-8        |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     | N   |     |     |     |     |     |
| SHV-9        | SHV-5a             |                         |    |    |    |    |     |     | R   |     |     | N   | V   |     | S   | K   |
| SHV-10       |                    |                         |    |    |    |    |     | G   | R   |     |     | N   | V   |     | S   | K   |
| SHV-11       | SHV-1-2a           |                         |    | Q  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| SHV-12       | SHV-5-2a           |                         |    | Q  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | S   | K   |
| SHV-24       |                    |                         |    |    |    |    |     |     |     |     | G   |     |     |     |     |     |

A: Alanin

D: Aspartik Asit

E: Glutamik Asit

F: Fenilalanin

G: Glisin

I: İzolösin

K: Lizin

L: Lösin

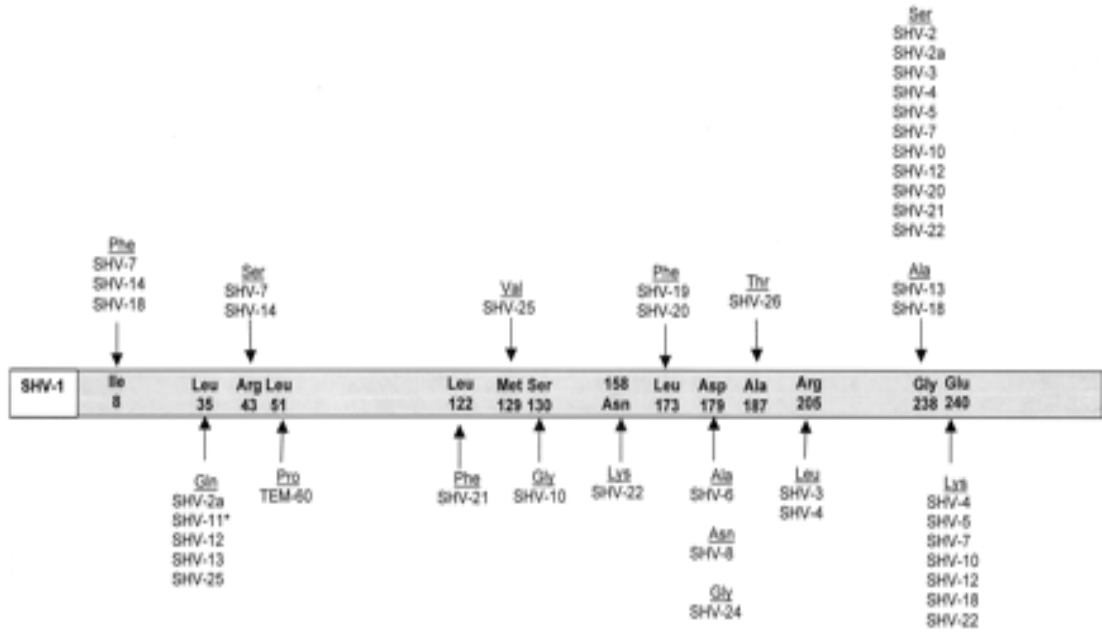
N: Asparjin

T: Treonin

V: Valin

W: Triptofan

SHV  $\beta$ -laktamazlarda oluşan amino asit değişikliklerinin çoğunluğu 238. pozisyonda bulunan glisinine yerine serin amino asitinin gelmesidir. Bunun dışında 179, 205 ve 240. pozisyonlardaki mutasyonlar da fenotipe karakteristik özellik kazandırır (Şekil 1) <sup>13,18,20</sup>.



Şekil 1. SHV' den Köken Alan Bazı GSBL' lerdeki Amino Asit Değişiklikleri<sup>18</sup>

### TEM Tipi Beta Laktamazlar

TEM tipi GSBL ilk kez 1965 yılında Yunanistan' da *E.coli* izolatından Temoneira adlı bir hastadan izole edilmiştir<sup>24</sup>.

TEM kökenli GSBL' ler en sık *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae*' de tanımlanmıştır. Bu enzim *E. coli*' deki ampisilin direncinin % 90' ından sorumludur<sup>18,31</sup>.

### **CTX-M Tipi Beta Laktamazlar**

Bu enzimler özellikle sefotaksimi substrat olarak tercih eden özelliğe sahiptirler. Başlıca *Salmonella typhimurium* ve *E. coli*' de tanımlanmış olmakla birlikte diğer bazı enterik Gram negatif bakterilerde de gösterilmiştir. TEM ve SHV kökenli enzimlerle en fazla %40 civarında benzerlik göstermektedirler<sup>13,20,31</sup>.

### **OXA Tipi Beta Laktamazlar**

OXA tipi beta laktamazlar oxasiline yüksek affinite gösterirler. Ambler sınıflamasında D moleküler grubunda yer alır. Bu enzimler esas olarak *Pseudomonas aeruginosa*' da tanımlanmıştır<sup>20</sup>.

### **PER Tipi Beta Laktamazlar**

*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %10' u, *A. baumannii* izolatlarının %40' ı bu enzimi taşıyarak seftazidime direnç göstermektedir<sup>20,35</sup>.

### **İnhibitör Dirençli Beta Laktamazlar (IRT)**

Bu enzimler TEM-1 ve TEM-2 enzimlerindeki mutasyonlar sonucu oluşan yeni varyantlardır. İnhibitörlere dirençli olan beta-laktamazlar (IRT) üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz edemezler, ancak TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL' ler ile birlikte ele alınmaktadır. IRT' ler en sık *E. coli*' de bulunmakla birlikte *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* ve *Citrobacter freundii*' de de bildirilmektedir<sup>36</sup>.

### **Karbapenemazlar**

Bu enzimler özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.' de bildirilmiştir. Aktif bölgelerinde çinko içerdiklerinden dolayı 'metallo  $\beta$ -laktamaz' olarak isimlendirilir<sup>36</sup>.

### **II. 4. 1. Beta-Laktamazların Saptanmasında Kullanılan Yöntemler**

GSBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesinin prevelansının yüksek olması, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığının tam olarak tespit edilmesini sağlayacak yöntemlere büyük bir gereksinim yaratmıştır. GSBL' leri tespit edebilmek için birtakım yöntemler kullanılmaktadır<sup>18</sup>.

#### **Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri**

Bunlar direnç genlerinin ekspresyonu sonucu ortaya çıkan fenotipin duyarlılık düzeyinin belirlendiği yöntemlerdir.

#### **CLSI GSBL Tarama Testleri**

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), GSBL üretiminin taranması için disk difüzyon ve dilüsyon yöntemlerinin kullanılmasını önermektedir.

#### **CLSI GSBL Doğrulama Testleri**

- Sefalosporin /Klavulonat Kombinasyon Diskleri:
- Sıvı Mikrodilüsyon:

#### **Çift Disk Sinerji Testi**

GSBL saptama yöntemleri Kirby-Bauer disk difüzyon metoduna dayanarak yapılmaktadır. Bu yöntemde Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine 0,5 McFarland' a göre hazırlanan bakteri süspansiyonu sürülür. GSBL

saptanması için amoksisilin+klavulanik asit (AMC) kombinasyonunun sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ) ve aztreonam (ATM) diski ile sinerjistik etkisi araştırılır. Merkezdeki amoksisilin+klavulanik asit (20/10 µg) diskinin 30 mm uzağına CTX, CAZ ve ATM diskleri yerleştirilir. CTX ve/veya CAZ ve/veya ATM zonlarında AMC zonuna doğru genişleme olması pozitif sinerji olarak değerlendirilir<sup>18,37</sup>.

### **Üç Boyutlu Test**

Antibiyotik diskinin 3 mm uzağına plağın merkezine doğru inen bir kesi yapılır. Agar zeminine incelenecek bakterinin McFarland 0,5'e göre ayarlanmış süspansiyonu homojen olarak yayılır ve agarda açılan çukur veya kesi boşluğu aynı bakterinin McFarland 5'e göre ayarlanmış süspansiyonu ile taşırmaksızın doldurulur. Bir gecelik inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonunun kesi veya çukur istikametinde bir daralma veya deformasyon gösterip göstermediği araştırılır<sup>18,37</sup>.

### **Etest GSBL Bantları**

Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir<sup>38</sup>.

### **Vitek GSBL Testi**

Laboratuvarlar, Vitek kartlarını kullanırken GSBL üreten mikroorganizmaların minimum inhibisyon konsantrasyon değeri  $\leq 8\mu\text{g/ml}$  iken,

mikroorganizmayı duyarlı olarak belirleyebilir. GSBL üretimini saptayan kartlar FDA tarafından onaylanmıştır<sup>39</sup>.

Vitek GSBL Testinde GSBL saptamasında sadece sefotaksim (0,5 µg/ml) ve seftazidimin (0,5 µg/ml) klavulanik asitle (4 µg/ml) kombinasyonu kullanılır<sup>18</sup>.

### **Moleküler Tespit Yöntemleri**

Doğrudan direnç genlerinin saptanabildiği yöntemlerdir.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

SHV ve TEM tipi enzimlere spesifik oligonükleotit primerler kullanılarak beta-laktamaz genleri tespit edilir. Beta-laktamaz enziminin varlığını saptamak için kullanılan en kolay ve yaygın moleküler yöntem beta-laktamaz genine spesifik oligonükleotit primerlerle yapılan PZR yöntemidir. Ancak PZR TEM ya da SHV varyantları arasında ayrımı sağlayamaz<sup>18</sup>.

### **Oligotiplendirme**

TEM-1 ve TEM-2 enzimleri arasında ayrımı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde; zor hibridizasyon koşulları altında oluşan nokta mutasyonlarının saptanması için tasarlanan oligonükleotit problemleri kullanılır. Bu yöntemin kullanılmasıyla klinik izolatlar arasındaki çeşitli yeni TEM varyantları saptanabilmektedir. Oligotiplendirmede kullanılan beta-laktamazlar bir radyoizotop veya biyotinle işaretlenir<sup>18</sup>.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi**

Bu yöntemde PZR ürünleri çeşitli restriksiyon enzimleriyle kesilir. Elde edilen bu bölgeler elektroforez yapılarak ayrılır. Her restriksiyon

enziminin meydana getirdiği bölgenin büyüklüğü yapısal gendeki nokta mutasyonlarını gösterir. Birçok GSBL saptama yöntemi içerisinde en kolay uygulanan yöntemdir. Ancak bu yöntem tüm SHV tipi GSBL varyantlarını tespit edemez<sup>40</sup>.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Tek Zincirde Konformasyon Polimorfizmi (PCR-SSCP)**

Bu yöntemde bla<sub>SHV</sub> geninin spesifik bir bölgesinde bir tek bazda meydana gelen mutasyonlar saptanabilmektedir<sup>40</sup>.

### **RSI-PCR (Restriction Site Insertion-Polymerase Chain Reaction)**

DNA dizisindeki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan basit ve hızlı bir tekniktir<sup>41,42,43</sup>. RSI-PCR yönteminde primerlerin 3' ucundaki 1, 2, veya 3 bazın değiştirilmesiyle gendeki spesifik kesim yerleri belirlenir. Bu yöntemde kesim yerlerine özgü restriksiyon endonükleazlar kullanılır.

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA' yı kesen yapılardır. Bugün yaklaşık olarak 3000' den fazla restriksiyon endonükleaz varlığından söz edilmektedir. Her bakteri, en az bir tane olmak üzere restriksiyon endonükleaza sahiptir.

Genomik yapı ve genetik dizilim, bakteri ya da virus aileleri, tipleri ve türleri arasında farklılık göstermektedir. Genomik farklılıklar etken DNA' sının restriksiyon endonükleazlarla kesilmeleri neticesinde ortaya konabilmektedir.

Restriksiyon endonükleazlar metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özelliklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre, tip I, II, III ve homing endonükleazlar olarak 4 genel grupta sınıflandırılır.

### **Tip I Enzimler**

Hem metilasyon hem de modifikasyon yapabilen enzimlerdir. Bu enzimler endonükleaz aktiviteleri için ATP, adenosylmethionin (adomet) ve  $Mg^{+2}$  ye ihtiyaç duyarlar.

### **Tip II Enzimler**

Bu enzimler tam hedef nükleotitten kesim yapma özellikleri nedeniyle klonlama ve moleküler biyoloji araştırmaları için ideal enzimlerdir.  $Mg^{+2}$  iyonlarının varlığında çift iplikçikli DNA üzerindeki palindromik dizilimleri tanıyan ve bu dizilim içindeki özel bir bölgeden kesen homodimerik enzimlerdir. Kesim sonucunda DNA' da oluşturdıkları uçların motiflerine göre iki gruba ayrılırlar. Bunlardan *Bam*HI, *Eco*RI ve *Crf*101 gibi enzimler DNA' nın 5' ucunda yapışkan uç oluştururken, *Eco*RV, *Hae*III ve *Pvu*II gibi enzimler DNA' da küt uçlar oluşturur.

### **Tip III Enzimler**

Tip I' ler gibi metilasyon ve modifikasyon yapabilen çok fonksiyonlu enzimlerdir ve ATP' ye bağlı kesim gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler DNA' ya tanıma bölgelerinden bağlanmalarına rağmen kesimi farklı bölgeden ve rasgele yapmaktadır. Kesim tanıma bölgesine yakın bir konumda gerçekleştirilmektedir. Bu yüzden Tip III enzimler klonlamada kullanılmamaktadır.

### **Homing Endonükleazlar**

İyi derecede korunmuş ve benzerlik gösteren protein yapılarına sahip, uzun (12–40 baz çifti) ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA' ya ihtiyaç duyan enzim grubudur. Diğer restriksiyon endonükleazlardan farklı olarak, bunlar daha az tanıma özgüllüğü göstermekte ve tanıma bölgelerindeki tek baz değişimini tolere edebilmektedir. DNA' nın yeniden yapılanmasında fonksiyoneldirler<sup>44</sup>.

### **DNA Probları**

Nükleik asit prob teknolojisi, amplifikasyon yöntemlerinden çok önce, yavaş üreyen veya üretilmeyen patojenlerin tespit edilebilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Prob bazlı yöntemler; kültürden identifikasyon, klinik örnekten direkt tanı ve nükleik asit ampifikasyonu sonunda elde edilen ampikonların (ürünlerin ) tanımlanması alanlarında kullanılmaktadır<sup>44</sup>.

### **Ligaz Zincir Reaksiyonu (LZR)**

Sistem DNA çoğaltılması amacı ile geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Bu sistem; primerlerden ampikonlar üretmek yerine, problemlerin amplifikasyonunu sağlar. PZR gibi termal döngü cihazına ihtiyaç duyulur.

Termostabil ligaz enziminin kullanıldığı LZR ile sadece iki primer boyu kadar uzunlukta ampikonlar elde edilir. Denatürasyon işleminden sonra, kalıp tek zincirli DNA üzerindeki hedef dizilere peş peşe yerleşen oligonükleoit problemler, termostabil ligaz enzimi yardımı ile birleştirilirler (ligasyon). Ligasyona uğramış oligonükleotit çiftleri ve orijinal diziler bir

sonraki siklusta kalıp olarak kullanılır. Böylece birinci siklusta iki adet kalıp DNA oluşur. Tekrarlayan denatürasyon, bağlanma ve ligasyon siklusları sonunda reaksiyon ürünlerinde eksponansiyel bir birikim gerçekleşir ve milyarlarca hedef dizi üretilir.

PZR ile yapılan çalışma sayısı çok daha fazla olmakla beraber LZR diyagnostik amaçlı çalışmalar için daha uygundur<sup>31,44</sup>.

### **Nükleotid Sekans Analizi**

Sekans analizinde; Klenow, Taq DNA polimeraz, reverse transkriptaz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak dizisi saptanacak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir.

Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, DNA polimerazların dNTP' lar yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP' ları da substrat olarak kullanılmaları esasına dayanır. Dizi analiz sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Otomatize sistemlerin çoğunda reaksiyonun başlangıcında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gözlenebilir hale getirilmektedir<sup>44</sup>.

### **Plazmid Profil Analizi**

Yöntemin prensibi izolatların plazmidlerinin elde edilmesine dayanmaktadır. Elde edilen plazmidler agaroz jelde yürütülerek parçaların sayıları ve büyüklükleri karşılaştırılır. Yöntemin dezavantajı hiç plazmid içermeyen ya da bir veya iki plazmid içeren izolatlarda ayırım gücünün düşük

olmasıdır. Yöntemin avantajı ise sadece elektroforez yapılan malzemenin gerekli olmasıdır <sup>44</sup>.

Tablo 5. GSBL Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

| Yöntem tipi                     | Yöntem                       | Avantajları                                                            | Dezavantajları                                                                                              |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri | CLSI GSBL tarama testleri    | Uygulanması kolaydır, her laboratuarda uygulanabilir.                  | GSBL' ler her zaman dirençli değildir.                                                                      |
|                                 | CLSI GSBL doğrulama testleri | Uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi kolaydır.                  | Duyarlılık, seçilen oxyimino-sefalosporine bağlıdır.                                                        |
|                                 | Çift disk sinerji testi      | Uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi kolaydır.                  | Optimal duyarlılık için disk yerleşim mesafeleri standardize edilmemiştir.                                  |
|                                 | Üç boyutlu test              | Duyarlıdır, sonuçların değerlendirilmesi kolaydır.                     | GSBL' ler için spesifik değildir.                                                                           |
|                                 | Etest GSBL bantları          | Uygulanması kolaydır.                                                  | Çift disk sinerji testi kadar duyarlı değildir ve sonuçların değerlendirilmesi her zaman kolay değildir.    |
|                                 | Vitek GSBL testi             | Uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi kolaydır.                  | Duyarlılığı düşüktür.                                                                                       |
| Moleküler Tespit Yöntemleri     | DNA problemleri              | Gen aileleri için spesifiktir. (SHV ya da TEM)                         | GSBL ve non-GSBL arasında, TEM veya SHV varyantları arasında ayrım yapılamaz.                               |
|                                 | PZR                          | Uygulanması kolaydır, Gen aileleri için spesifiktir. (SHV ya da TEM)   | GSBL ve non-GSBL arasında, TEM veya SHV varyantları arasında ayrım yapılamaz.                               |
|                                 | Oligotiplendirme             | Spesifik TEM varyantları tespit edilir.                                | Spesifik oligonükleotit problemleri gerektirir, yeni varyantlar tespit edilemez.                            |
|                                 | PCR-RFLP                     | Uygulanması kolaydır, spesifik nükleotit değişiklikleri tespit edilir. | Tespit edilebilmesi için restriksiyon bölgelerinin farklı nükleotit değişiklikleriyle sonuçlanması gerekir. |
|                                 | PCR-SSCP                     | Birkaç SHV varyantları arasındaki farklılıklar tespit edilir.          | Özel elektroforez şartları gerektirir.                                                                      |
|                                 | LCR                          | Birkaç SHV varyantları arasındaki farklılıklar tespit edilir.          | Çok fazla oligonükleotit primerleri gerektirir.                                                             |
|                                 | Nükleotit sekans analizi     | Altın standarttır, bütün varyantlar tespit edilir.                     | Yoğun çalışma gerektirir, teknik olarak karmaşık olabilir.                                                  |

## **II. 5. Moleküler Epidemiyoloji**

Moleküler epidemiyoloji, enfeksiyon etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması, tiplendirilmesi, enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve patogeneze sorumlu genlerin saptanması, potansiyel genetik ve çevresel risk faktörleri, enfeksiyon hastalıklarının aile içi ve toplumlar arasında yayılmasının önlenmesi üzerinde durur<sup>44</sup>.

Belli bir etkene bağlı enfeksiyonun prevalansında artış olması, bir hasta grubundan aynı tür bakterinin izole edilmesi, belli antibiyotik duyarlılık profili veya biyotipe sahip izolatların varlığı epidemiyolojik araştırmaları gerektirmektedir<sup>44</sup>.

### **III. MATERYAL VE METOT**

#### **III. 1. Materyal**

##### **Cam Malzemeler**

1. Test tüpü (Değişik ebatlarda)
2. Petri plağı
3. Ependorf tüp

##### **Cihazlar**

1. Otoklav (Nüve OT 4060)
2. Pastör fırını (Heraeus NR 900)
3. Etüv (Nüve)
4. Sıcak su banyosu (Schwabach)
5. Hassas terazi (Denver)
6. Termal cyclor cihazı (Prismus Peqlab-Almanya)
7. Elektroforez tankı (CSL-İngiltere)
8. Agaroz jel görüntüleme cihazı

##### **Laboratuar Malzemeleri**

1. Öze (platin)
2. Otomatik pipetler
3. Tüplük
4. Bunsen beki
5. Laminar flow (BioLab)

##### **Besiyerleri**

1. Eozin metilen mavisi agar besiyeri (EMB) (Merck)

2. Müller Hinton sıvı besiyeri (MHB) (Merck)

#### **Antibiyotik Diskleri**

1. Amoksisilin/ Klavulonat (AMC) ( )
2. Seftazidim (CAZ) ( )
3. Sefotaksim(CTX) ( )
4. Seftriakson (CRO) ( )

#### **Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler**

1. Tris-HCl tamponu (Merck)
2. PZR tamponu
3. Tris-Borik asit-EDTA tamponu (Dr.Zeydanlı, Türkiye)
4. 25 mM MgCl<sub>2</sub>
5. dNTP ( Larova-Almanya)
6. Primer dizileri (Metis Biyoteknoloji)
7. Taq DNA polimeraz (Hotstart Bioron-Almanya)
8. Agaroz (Serva-Almanya)
9. Etidyum bromür (Dr.Zeydanlı, Türkiye)
10. Yükleme tamponu (Dr.Zeydanlı, Türkiye)
11. 100 bp moleküler ağırlık belirteci
12. *Hinf*I restriksiyon enzimi (Vivantis)

## **Çalışmada Kullanılan Tamponlar**

### **PZR için gerekli tamponları**

Tepkime Tamponu (10X)

1000 mM Tris-HCL, pH 8.3

500 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

%0.01 (w/v) jelatin

%50 Gliserol (v/v)

100 mM KCl

20 mM Tris-HCl pH 8

0.1 mM DTT

%0.5 Tween 20

%0.5 Nonidet p 40

Taq Polimeraz (5 ünite/ml)

10 mM dNTP (10X)= Her bir deoksiribonükleotidden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

### **Agaroz Jel Elektroforez Tamponları**

Agaroz = %3'lük (enzim kesimi için)

3 g agaroz

100 ml 0.5X TBE

= %2'lik (PZR ürünleri)

2 g agaroz

100 ml 0.5X TBE

= %1' lik

1 g agaroz (DNA varlığı)

100 ml 0.5X TBE

TBE tamponu (10X) = Tris baz (90mM)

Borik asit (90mM)

Na-EDTA (2mM)

Toplam hacim distile su ile 1 000 ml'ye tamamlanır.

TBE tamponu (0.5X) = 5 ml 10X TBE tamponu

Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Yükleme tamponu = % 0.25 Brom fenol mavisi

% 40 (w/v) Sukroz

Etidyum bromür = 10 mg etidyum bromür

1 ml distile su

### **DNA Amplifikasyonunda Kullanılan Primerler**

bla<sub>SHV-1</sub> geninin 179. pozisyonundaki amino aside göre düzenlenmiş primer çifti kullanılmıştır.

### Primer dizileri

179. pozisyonundaki amino asitteki mutasyonu gösteren primer

Primer 1:

5' - TCAGCGAAAAACACCTTGC -3'

Primer 2:

5' - ATGCTGGCCGGGGTAGTGGAG -3'

### 233 Baz Çiftlik Amplifikasyon Ürününün Kesimi İçin Kullanılan

#### Restriksiyon Enzimi

*Hin*fl Enzimi (Vivantis) : 5'..... G\*ANTC....3'

3'..... CTNA\*G....5'

\* Enzim Kesim Bölgesi

**Fotoğraf çekimi:** Canon PC1089

### III. 2. Klinik Örnekler

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında *Klebsiella pneumoniae* olarak belirlenen 144 örneğin 38'i disk diffüzyon testi ile GSBL (+) olarak tespit edilmiş ve hastane enfeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane enfeksiyonu etkeni olarak belirlenmiş 15 *Klebsiella pneumoniae* örneği çalışılmıştır. Her hastanın, adı soyadı, yaşı, cinsiyeti, geldiği servis ve numunenin alındığı yer kaydedildi. RSI-PCR'da pozitif kontrol olarak GSBL (+) olduğu bilinen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 numaralı suşu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak DNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

### **GSBL Doğrulama Testi**

CLSI önerilerine göre disk difüzyon standartlarına uygun olarak yapılmıştır. 0,5 M Farland bulanıklığına göre ayarlanan bakteri süspansiyonu Müller Hinton agar besiyeri üzerine yayılmıştır. Plağın merkezine amoksisilin-klavulonik asit (10+20µg) diski yerleştirilmiştir. Diskin 30 mm uzağına seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve sefepim (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Antibiyotiklerin inhibisyon zonlarının arasında üremenin olmadığı bir bölgenin olması GSBL pozitifliği göstermiştir.

### **DNA İzolasyonu**

*Klebsiella pneumoniae* izolatları Müller-Hinton Agar besiyerine ekimi yapıldı ve bir gece 37 °C’ de etüvde inkübe edildi. Bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı<sup>45</sup>. Bakteri kültüründen 3-5 koloni alınarak üzerine 100 µl 0,1 mM Tris pH 7.0 çözeltisi eklendi. Su banyosunda 100 °C’ de 10 dakika bekletilerek DNA izolasyonu yapıldı.

### **İzole Edilen DNA’ ların Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi**

İzole edilen DNA’ ların varlığı % 1’lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterildi.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

RSI-PCR yönteminde kalıp olarak *Klebsiella pneumoniae* DNA’ sının 6 µl kullanıldı.. RSI-PCR toplam 50 µl’ lik hacimde yapıldı. 50 µl’ lik reaksiyon karışımı; 5 µl tampon, 1,25 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl dNTP, her bir primerden 1 µl, taq DNA polimeraz enziminden 0,5 µl ve 41,05 µl distile su olacak şekilde hazırlandı.

Amplifikasyon, DNA Isı Döngü (Thermal Cycler) cihazında gerçekleştirildi.

Amplifikasyon :

|                                         |       |           |               |
|-----------------------------------------|-------|-----------|---------------|
| Başlangıç denatürasyonu                 | 95 °C | 3 dakika  |               |
| Denatürasyon aşaması                    | 95 °C | 30 saniye | } 30<br>Döngü |
| Primerlerin yapışma (annealing) aşaması | 60 °C | 30 saniye |               |
| Sentez (Uzama) aşaması                  | 72 °C | 30 saniye |               |
|                                         | 72 °C | 5 dakika  |               |

#### **Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi**

Amplifikasyondan sonra amplifiye edilen ürünlerin değerlendirilmesi; etidyum bromür içeren % 2' lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Agaroz jel elektroforezi için 10 µl' lik PZR ürünü 5 µl yükleme solüsyonu (%40 sukroz, %0,25 brom fenol blue) kullanıldı. Ultraviyole lamba altında RSI-PCR ile çoğaltılan DNA bantları incelendi ve fotoğrafı çekildi.

#### **RSI-PCR Ürünlerinin *HinfI* Restriksiyon Enzimi İle Kesilmesi**

Amplifiye edilen ürünler *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir

*HinfI* enzimi ile kesim işlemi:

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| <i>HinfI</i> enzimi:        | 1 µl (10 ünite) |
| <i>HinfI</i> enzim tamponu: | 1,5 µl          |
| Amplifiye ürün:             | 11 µl           |
| Distile su:                 | 2 µl            |
| Toplam Hacim:               | 15,5 µl         |

Toplam hacim 15,5 µl olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı; 37 °C' de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda 10 µl' lik kesim ürünü, etidyum bromür içeren % 3' lük agaroz jel elektroforezine yüklendi. Ultraviyole ışığında *HinfI* enzimi ile elde edilen bantlar incelendi ve fotoğrafı çekildi.

#### IV. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen, tiplendirilmesi ve antibiyogram testleri yapılmış 144 klinik materyalden, disk diffüzyon yöntemine göre GSBL (+) olduğu belirlenen 53 *Klebsiella pneumoniae* örneği çalışmaya alınmıştır. Bunlardan 38'i poliklinik hastalarından, 15 tanesi de hastane enfeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane enfeksiyonu etkeni olarak belirlenmiş örneklerden alınmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. *Klebsiella pneumoniae* 'nın Poliklinik Hastaları ve Hastane Enfeksiyonu İzolatlarındaki Dağılımı

|                     | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Yüzde (%) |
|---------------------|------------------------------|-----------|
| Poliklinik Hastası  | 38                           | 71,6      |
| Hastane enfeksiyonu | 15                           | 28,4      |
| Toplam              | 53                           | 100       |

Poliklinik hastalarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae* örneklerinden 18 örnek idrardan, 3 örnek yaradan, 9 örnek kandan, 1 örnek apsedan (pü), 3 örnek balgamdan, 1 örnek kateterden, 2 örnek peritondan ve 1 örnek beyin omurilik sıvısından (BOS) izole edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Poliklinik Hastalarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'nin İzolasyon Kaynaklarına Göre Dağılımı.

|         | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Yüzde (%) |
|---------|------------------------------|-----------|
| İdrar   | 18                           | 47,4      |
| Balgam  | 3                            | 7,9       |
| Yara    | 3                            | 7,9       |
| Pü      | 1                            | 2,6       |
| Kan     | 9                            | 23,7      |
| Kateter | 1                            | 2,6       |
| Periton | 2                            | 5,3       |
| BOS     | 1                            | 2,6       |
| Toplam  | 38                           | 100       |

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae* örneklerinden 2'si abseden (pü), 3'ü kandan, 5'i endotrakeal aspirasyondan, 1'i boğazdan, 1'i beyin omurilik sıvısından ve 3'ü idrardan izole edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Hastane Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'nin İzolasyon Kaynaklarına Göre Dağılımı

|                        | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Yüzde (%) |
|------------------------|------------------------------|-----------|
| İdrar                  | 3                            | 20        |
| Endotrakeal Aspirasyon | 5                            | 33,3      |
| Boğaz                  | 1                            | 6,7       |
| Pü                     | 2                            | 13,3      |
| Kan                    | 3                            | 20        |
| Beyin omurilik sıvısı  | 1                            | 6,7       |
| Toplam                 | 15                           | 100       |

Poliklinik hastalarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının servislere göre dağılımı belirlenmiştir. 10 izolat Genel Cerrahi, 9 izolat Pediatri, 6 izolat Yoğun Bakım, 2 izolat Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, 8 izolat Üroloji, 3 izolat Kalp ve Damar Cerrahi servisinden alınmıştır. (Tablo 9).

Tablo 9. Poliklinik Hastalarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*

İzolatlarının Servislere Göre Dağılımı.

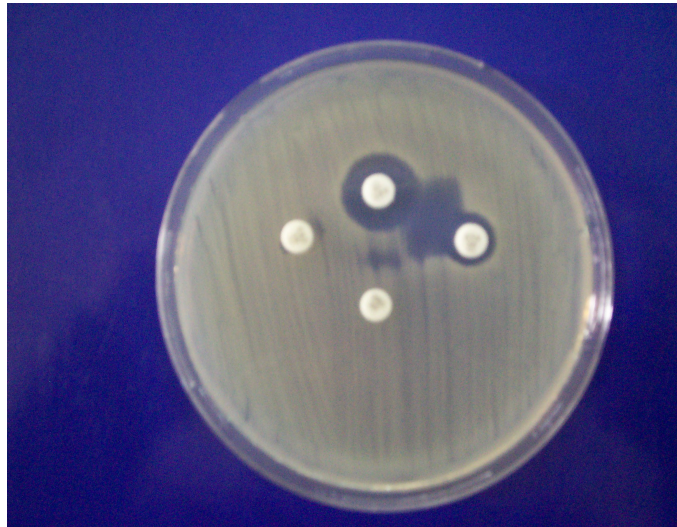
|                                | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Yüzde (%) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------|
| Genel Cerrahi                  | 10                           | 26,3      |
| Pediyatri                      | 9                            | 23,7      |
| Yoğun Bakım                    | 6                            | 15,8      |
| Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon | 2                            | 5,3       |
| Üroloji                        | 8                            | 21,1      |
| Kalp ve Damar Cerrahi          | 3                            | 7,8       |
| Toplam                         | 38                           | 100       |

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen *Klebsiella pneumoniae* 'nin servislere göre dağılımı belirlenmiştir. 2 tanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi, 2 tanesi Genel Cerrahi Servisi, 1 tanesi Enfeksiyon Hastalıkları Servisi, 9 Tanesi Yoğun Bakım Ünitesi ve 1 tanesi de Onkoloji Servisinden alınmıştır(Tablo 10).

Tablo 10. Hastane Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*’ lerin Servislere Göre Dağılımı.

|                                           | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Yüzde (%) |
|-------------------------------------------|------------------------------|-----------|
| Genel Cerrahi                             | 2                            | 13,3      |
| Kemik İliği<br>Transplantasyon<br>Ünitesi | 2                            | 13,3      |
| Yoğun Bakım                               | 9                            | 60        |
| Enfeksiyon                                | 1                            | 6,7       |
| Onkoloji                                  | 1                            | 6,7       |
| Toplam                                    | 15                           | 100       |

Toplanan *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının GSBL pozitifliği çift disk sinerji testiyle de doğrulanmıştır (Şekil 2).



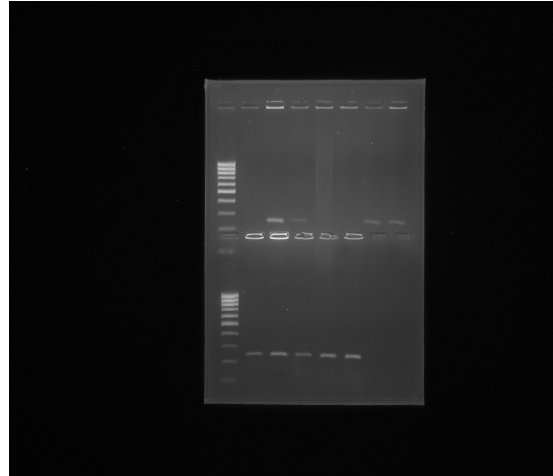
Şekil 2: Çift Disk Sinerji Testi

Toplam 53 izolattan 41'i RSI-PCR yöntemiyle SHV  $\beta$ -laktamazın 179. pozisyonundaki amino asiti etkileyen mutasyona göre düzenlenmiş primerler kullanılarak çoğaltılmıştır (Tablo 11).

Tablo 11: RSI- PCR Tekniği için Kullanılan Primerler ve Restriksiyon Enzimleri

| Amino Asit Bölgesi | Oligonükleotit sekansı (5'-3' )                | Restriksiyon Tanıma Bölgesi  | PCR Ürünü (bç) | Kesilen PCR Ürününün Büyüklüğü (bç) | Mutasyon Taşıyan Varyantlar                                              |
|--------------------|------------------------------------------------|------------------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 179                | TCAGCGAAAAACACCTTGC<br>ATGCTGGCCGGGGTAGTAGTGAG | 5' G*ANTC 3'<br><i>HinfI</i> | 233            | 214, 19                             | bla <sub>SHV-6</sub> , bla <sub>SHV-8</sub> ,<br>bla <sub>SHV-24</sub> . |

RSI-PCR ile çoğaltılan 233 baz çiftlik amplifikasyon ürünü % 2' lik agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. 233 Baz Çiftlik Bölge.

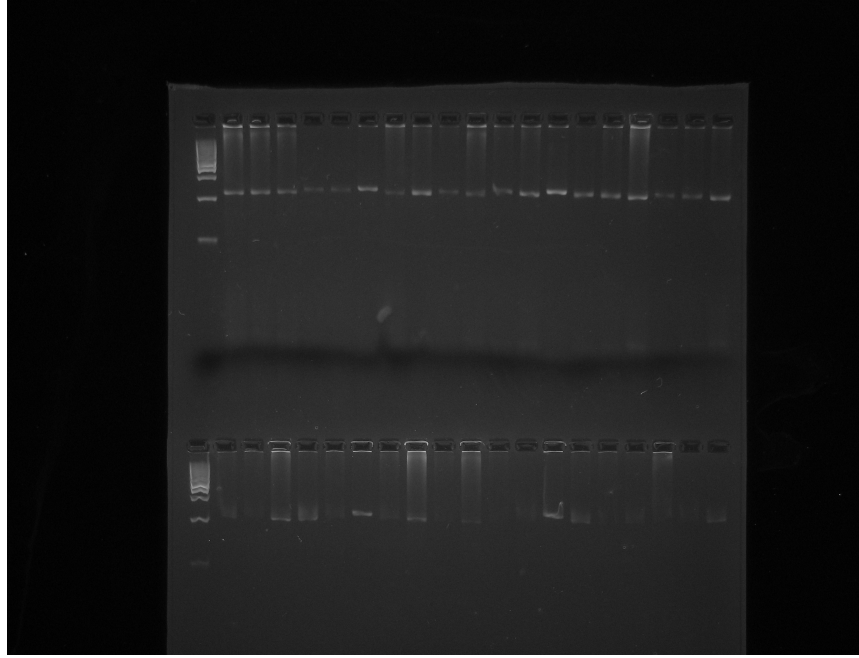
1. Tarak: 1- 100 bç marker, 2- GSBL (-) suş, 3- GSBL (+) suş, 4- GSBL (-) suş, 5- DNA içermeyen PZR karışımı, 6- GSBL (-) suş, 7,8- GSBL (+) suş
2. Tarak: 1- 100 bç marker 2- ATCC 700603 *Klebsiella pneumoniae*, 3,4,5,6- GSBL (+)

Poliklinik hastalarından 32 tanesi, hastane enfeksiyonlarından 9 tanesi RSI-PCR' la çoğaltılmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. RSI-PCR ile Çoğaltılan Klinik Materyallerin Dağılımı

|                      | RSI-PCR (+) | Yüzde (%) |
|----------------------|-------------|-----------|
| Poliklinik Hastaları | 32          | 78,1      |
| Hastane Enfeksiyonu  | 9           | 21,9      |
| Toplam               | 41          | 100       |

PZR de çoğaltılan ürünler *HinfI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmiştir. Kesim sonucu oluşan bantların büyüklüğü % 3' lük agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca sonuçlar SynGene Gene Tools programıyla kontrol edilmiştir. *HinfI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen örnekler 233 baz çiftlik bölgede mutasyon taşımaktadırlar. Kesilen bu örneklerde 214 bp uzunluğunda bir fragment tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 4- Restriksiyon Endonüklaz Enzimiyle Kesilen bla<sub>SHV</sub> Varyantları

1. Tarak: 1- 100 bp marker, 2,3,4- bla<sub>SHV</sub>-6, bla<sub>SHV</sub>-8, bla<sub>SHV</sub>-24 varyantları, 5,6,7- Diğer bla<sub>SHV</sub> varyantları

RSI-PCR ile çoğaltılan 41 örnekten 23 adedi *Hin*fI enzimi ile kesilmiş, 18 klinik örnek ise *Hin*fI enzimi ile kesilmemiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Poliklinik Hastaları ve Hastane Enfeksiyonu Örneklerinin *Hin*fI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

|                                     | Poliklinik Hastası | Hastane Enfeksiyonu |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Hin</i> fI enzimi ile kesilen    | 20                 | 3                   |
| <i>Hin</i> fI enzimi ile kesilmeyen | 12                 | 6                   |
| Toplam                              | 32                 | 9                   |

*Hinf*I ile kesilen örneklerin bla<sub>SHV</sub>-6, bla<sub>SHV</sub>-8 ve bla<sub>SHV</sub>-24 varyantlarından biri olduğu saptanmıştır. SHV beta laktamazın 179. pozisyonundaki aspartik asitte mutasyonlar sonucu değişiklikler meydana gelmektedir. Mutasyon sonucunda 179. amino asit olan aspartik asit yerine alanin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-6, asparajin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-8, glisin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-24 varyantları oluşmaktadır (Tablo 4).

*Hinf*I ile kesilmeyen örneklerin varyantlarının tespit edilebilmesi için , çalışılan bölgenin dışında ilave 3 ayrı bölgenin kullanılması gerekmektedir.

## V. TARTIŞMA

Gerek beta-laktamazlara gerekse diğer direnç mekanizmalarına bağlı olarak ortaya çıkan antimikrobiyallere direnç sorunu, esas olarak hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalarda önem taşımaktadır. Hastane enfeksiyonlarına neden olan bakteriler, bunların antibiyotik duyarlılıkları ve direnç profillerinin izlenmesi, hem direncin engellenmesi için önlem alınabilmesine, hem de erken ve etkili antibiyotik tedavisine olanak verebilir. Bunun sağlanması için en uygun, en kolay ve en güvenilir yöntemle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığını saptamak kontrol önlemlerinin alınması açısından önem taşımaktadır.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığı antibiyotik kullanım özelliklerine bağlı olarak ülkeler, hastaneler, hatta aynı hastane içindeki farklı klinikler arasında da değişiklikler gösterebilir<sup>46</sup>.

Çalışmamızda disk diffüzyon ve RSI-PCR yöntemleriyle dirençli olarak tespit edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının, % 26.3'ü genel cerrahi, % 23.7'si pediatri ve % 21.1 üroloji servisindeki poliklinik hastalarına ait olduğu belirlenmiştir (Tablo 9). Servislerdeki yüzdelere göre, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten suşlara en fazla genel cerrahi, pediatri ve üroloji servislerinde rastlanmaktadır. 41 klinik izolatla yapılan bir çalışmada genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten suşların en fazla yeni doğan servisinden izole edildiği belirtilmiştir<sup>47,48</sup>.

Yaptığımız çalışmada, yoğun bakımda yatan hastalarda % 15.8 gibi yüksek bir oranda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitifliği

saptanmıştır (Tablo 9). Kolar ve arkadaşları, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitif suşların en çok yoğun bakım ünitelerinde rastlandığını tespit etmişlerdir<sup>49</sup>.

Çalışmamızın ikinci grubunu hastaneye giriş ve çıkışından sonra hastane enfeksiyon kontrol komitesi tarafından izlenen ve *Klebsiella pneumoniae* olduğu tespit edilen hastalar oluşturmaktadır. Bu hasta grubunda tespit edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının %60' ının yoğun bakım ünitesinde %13,3' nün ise genel cerrahi servisinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

*Klebsiella pneumoniae'* nin hastane enfeksiyonu etkeni olarak saptandığı örneklerin çoğunluğu endotrakeal aspirasyondur (% 33.3). Ayrıca eşit oranda idrar (%20) ve kan (%20) örnekleri endotrakeal aspirasyondan sonra en sık rastlanan materyallerdir. Kolar ve arkadaşları da genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının en fazla solunum yolu materyallerinden elde ettiklerini bildirmişlerdir<sup>49</sup>.

Polikliniğe başvuran hastalar arasında kullanılan materyallerin çoğunluğunu ise idrar (% 47.4) ve kan örnekleri (% 23.7) oluşturmaktadır. Verilen yüzdelere göre, her iki grupta da idrar ve kan örnekleri en sık rastlanan materyallerdir.

Paterson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığını saptadıkları *Klebsiella pneumoniae* suşlarını en sık kandan izole ettiklerini açıklamışlardır<sup>29</sup>.

SHV genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerde ve *Klebsiella pneumoniae'* de yaygın olarak

bulunmaktadır.<sup>13,32,50</sup>. Bu enzimin araştırılmasında izoelektrik odaklama ve nükleotid dizi analizi gibi yöntemler kullanılır. Ancak bu teknikler zaman alan ve pahalı olan tekniklerdir. SHV  $\beta$ -laktamaz enzimini kodlayan genin ve SHV varyantlarının belirlenmesinde; tek iplikli konformasyonel polimorfizm (PCR-SSCP), ligaz zincir reaksiyonu, PZR-restriksiyon uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) ve restriksiyon insersiyon-PCR (RSI-PCR) gibi yöntemler kullanılmaktadır<sup>42,43</sup>. Mutasyonların belirlenmesinde PCR-SSCP yöntemini kullanmanın bir kaç dezavantajı vardır. Bunlardan biri varyant farklılıklarının ortaya konmasındaki zorluk ve rutin laboratuvarlarda olmayan pahalı aletleri gerektirmesi nedeniyle tercih edilmemektedir. SHV varyantlarının tiplendirilmesinde ligaz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmış, ancak bu teknikte gerekli kit ve malzemelerin pahalı olması rutin laboratuvarlara bu yöntemin uygulanabilirliğini kısıtlamıştır<sup>51</sup>. Bu yöntemlerin dezavantajlarına karşın bu moleküler epidemiyolojik metodlar araştırma alanında halen kullanılmaktadır<sup>52</sup>.

PCR-RFLP analizi ile bla<sub>SHV</sub> genleri varyantlarının ayrımı yapılabilmektedir<sup>18</sup>. Ancak bla<sub>SHV-3</sub>, bla<sub>SHV-4</sub>, bla<sub>SHV-7</sub> ve bla<sub>SHV-13</sub> varyantlarının ayrımı bu yöntemle yapılamamaktadır. Bu yöntemle bu dört bla<sub>SHV</sub> varyantının ayrımını yapabilmek için PCR-SSCP yönteminin de birlikte kullanılması gereklidir<sup>40,43</sup>. Ayrıca bla<sub>SHV-1</sub>, bla<sub>SHV-6</sub> ve bla<sub>SHV-8</sub> varyantlarının ayrımı PCR-RFLP ve PCR-SSCP yöntemleri birarada kullanılsa bile yapılamamaktadır<sup>40</sup>.

RSI-PCR yöntemi ise PCR-RFLP yönteminin belirleyemediği tüm bla<sub>SHV</sub> varyantlarını belirleyebilmektedir. RSI-PCR'ın birçok avantajından

dolayı çalışmamızda bu yöntemi kullanarak *Klebsiella pneumoniae*' nin beta laktamaz direncini ve dirençli suşların varyant tiplerini belirledik. RSI-PCR, DNA dizisindeki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan basit ve hızlı bir tekniktir<sup>41,42,43</sup>. PCR-RFLP ve PCR-SSCP yöntemlerinin belirleyemediği bla<sub>SHV</sub>-6, bla<sub>SHV</sub>-8 ve bla<sub>SHV</sub>-24 varyanlarını ayırımı bu teknik sayesinde yapabildik<sup>53</sup>.

RSI-PCR yönteminde primerlerin 3' ucundaki 1, 2, veya 3 bazın değiştirilmesiyle bla<sub>SHV</sub>-1' deki hedef restriksiyon yerleri belirlenir. bla<sub>SHV</sub> varyantları 1-7 amino asitin değişmesiyle bla<sub>SHV</sub>-1' den oluşmuştur. Çalışmamızda RSI-PCR tekniğini kullanarak SHV β-laktamazda 179. pozisyondaki amino asiti etkileyen mutasyonu çoğaltan primer çifti kullanılmıştır. Bu primer 3' ucundaki 1 bazın değişikliği ile oluşturulmuştur. Poliklinik hastalarından 32 tanesi, hastane enfeksiyonlarından 9 tanesi RSI-PCR'la çoğaltılmıştır (Tablo 14).

RSI-PCR ile çeşitli pozisyonlardaki amino asitleri etkileyen mutasyonları taşıyan varyantlar gösterilebilmektedir<sup>53</sup>. 179. pozisyondaki amino asitte mutasyon taşıyan varyantların gösterilmesi için, bir çift primer kullanarak bla<sub>SHV</sub>-1 bölgesi çoğaltılmış ve elde edilen 233 baz çifti (bç) uzunluğundaki ürün *Hinf*I enzimi ile kesilmiştir. 53 örnekten 23'ü *Hinf*I enzimi ile kesilmiş, 18 örnek ise aynı enzimle kesilmemiştir (Tablo 13). Çoğaltılan ürünlerin *Hinf*I enzimiyle kesilip kesilmemesine göre ayrımları, ürünlerin uzunluklarındaki farklılıklarına göre yapılmıştır. Kesilen ve kesilmeyen ürünler %3'lük agaroz jel elektroforezinde gözlenen bantlara göre değerlendirilmiştir. 233 bç

uzunluğundaki ürün; eğer *Hinf*I enzimi ile kesilmiş ise; 214 bp uzunluğunda bir bant gözlenmiştir. Bu örneklerin bla<sub>SHV</sub>-6, bla<sub>SHV</sub>- 8 ve bla<sub>SHV</sub>-24 varyantları olduğuna karar verilmiştir. 179. amino asiti etkileyen mutasyon sonucu aspartik asit yerine alanin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-6, asparajin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-8, glisin amino asidinin gelmesiyle bla<sub>SHV</sub>-24 varyantları oluşmuştur. Eğer çoğaltılan ürün aynı enzimle kesilmemişse; 233 bp uzunluğundaki PZR ürünü olan bant gözlenmiştir (Şekil. 1). Bu iki ürünün uzunluklarındaki farklılıklardan dolayı ayrımları kolaylıkla yapılmıştır. Eğer ürün kesilmemişse; çalışmamızda kullandığımız 179. pozisyonundaki amino asitteki mutasyonu taşıyan varyantların dışında diğer varyantlar olabileceği düşünülmüştür. *Hinf*I enzimi ile kesilmeyen ürünlerin 8, 205, 238 ve 240. pozisyonundaki amino asitlerde mutasyon taşıyan primerlerin kullanılmasıyla çoğaltılması gerekmektedir. SHV  $\beta$ -laktamaz varyantları çoğunlukla 238. ve 240. pozisyonundaki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (Tablo 4) <sup>18</sup>.

Çalışmamızda RSI-PCR yöntemi klasik ve diğer moleküler tekniklere göre duyarlı özgün ve daha fazla sayıda varyant tiplerini belirleyebilmesi nedeniyle seçilmiştir. Sadece RSI-PCR tekniğinin kullanılmasıyla *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında SHV  $\beta$ -laktamaz geninin varlığı gösterilerek dirençli olup olmadıkları tespit edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının dirençli olduklarının belirlenmesinin yanısıra çeşitli pozisyonlarda mutasyon taşıyan varyantların tiplendirilmesi de RSI-PCR yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmada 179. pozisyonundaki mutasyonu gösteren SHV  $\beta$ -laktamaz gen bölgesine özgü primer çifti kullanılmıştır. Bu nedenle *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında

sadece üç çeşit varyantın tespiti yapılabilmektedir. Bu bölgenin dışında, diğer bölgelerde bulunabilecek mutasyonları belirleyebilecek primerlerin kullanılması ile tespit edilecek varyant sayısı 17'ye kadar çıkarılabilecektir. SHV  $\beta$ -laktamaz gen bölgesine özgü yeni mutasyonların belirlenebilmesi için nükleotid dizi analizi yöntemleri gerekmektedir.

Materyallerin toplandığı Gazi Hastanesi dışında da Ankara' da bulunan diğer hastanelerden de örneklerin toplanıp incelenmesiyle dirençli *Klebsiella pneumoniae* sayısı ve servislere göre dağılımı belirlenerek direnç gelişiminin önlenmesi için gerekli önlemler alınabilecektir.

## VI. SONUÇ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına değişik servislerden gelen hasta örneklerinden disk diffüzyon yöntemi ile GSBL (+) olduğu belirlenen 53 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı.

*Klebsiella pneumoniae* izolatlarında 179. pozisyonda mutasyon taşıyan varyantların belirlenebilmesi için RSI-PCR kullanıldı. 53 GSBL (+) *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatının 41'i 179. pozisyonundaki amino asidi etkileyen mutasyonları belirleyen primerlerle amplifiye edildi. Amplifiye edilen ürünlerde 179. pozisyonundaki amino asidi etkileyen mutasyonları belirleyebilmek için PZR ürünleri *HinfI* enzimi ile kesildi. Kesilen ve kesilmeyen ürünlerin ayrımı uzunluklarındaki farklılıklardan dolayı %3' lük agaroz jel elektroforezinde kolaylıkla yapıldı. Kesim sonucunda 23 izolatın 179. pozisyonundaki amino asidinde mutasyon saptandı ve bu mutasyonlara göre varyant tipleri belirlendi (blaSHV-6, blaSHV-8, blaSHV-24 ). 179. amino asit olan aspartik asit yerine alanin amino asidinin gelmesiyle blaSHV-6, asparajin amino asidinin gelmesiyle blaSHV-8, glisin amino asidinin gelmesiyle blaSHV-24 varyantları mutasyonlar sonucu oluşmuştur.

Çalışmamızda beta laktamazların varyantlarının belirlenmesinde RSI-PCR yönteminin kullanılmasıyla; *Klebsiella pneumoniae'* nin antibiyotiklere direnç durumları ve GSBL varlığı arasındaki ilişki incelenmiş ve dirençte hangi GSBL varyantlarının etkili olduğu belirlenmiştir.

## VII. ÖZET

Genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar *Klebsiella pneumoniae*'da yaygın olarak bulunur. SHV tipi  $\beta$ -laktamazları kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar çeşitli bla<sub>SHV</sub> varyantlarının oluşmasına neden olur.

Direnç genlerini taşıyan suşların rutin yapılan mikrobiyolojik testlerin yanı sıra daha duyarlı olan moleküler teknikleri kullanarak tespit edilmesi önemlidir.

*Klebsiella pneumoniae* izolatlarında GSBL'lerin varlığı restriksiyon site insersiyon-PZR (RSI-PCR) yöntemiyle incelenmiş ve GSBL varyantları tespit edilmiştir. Basit ve hızlı bir teknik olan RSI-PCR tekniği *Klebsiella pneumoniae* izolatlarındaki nokta mutasyonlarının belirlenebilmesi için SHV  $\beta$ -laktamaz geninin 179. pozisyonundaki amino asiti etkileyen mutasyonları belirleyen primer çifti kullanılmış ve tek bir restriksiyon enzimiyle bu bölgede mutasyon taşıyan varyantlar gösterilmiştir.

53 *Klebsiella pneumoniae* izolatından 41' i *Hinf*I enzimi ile kesilmiştir. Bunlardan 23' ünün bla<sub>SHV-6</sub>, bla<sub>SHV-8</sub> ve bla<sub>SHV-24</sub> varyantı olduğu belirlenmiştir.

## VIII. SUMMARY

SHV Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases are widely present in the species of *Klebsiella pneumoniae*. The mutations that occurs in SHV Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases causes new SHV variants.

It's important that determine the isolates that carrying of resistance genes using more sensitive molecular techniques besides the routine microbiological tests. Presence of ESBL in *Klebsiella pneumoniae* and ESBL variants was detected by RSI-PCR technique. Restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) is a simple, rapid technique for detection of point mutations at *Klebsiella pneumoniae*. Mismatch primers were designed to detect mutations affecting amino acids at positions 179 and variants carrying mutation have been showed with only one restriction enzyme.

41 of the 53 *Klebsiella pneumoniae* isolates were digested by *HinfI* restriction enzyme. 23 of them were determined bla<sub>SHV-6</sub>, bla<sub>SHV-8</sub> and bla<sub>SHV-24</sub> variants.

## **X. KAYNAKLAR**

1. USTAÇELEBİ, Ş. Ed., MUTLU, G., İMİR T., CENGİZ, A., TÜMBAY ,E., METE, Ö.: Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji, (1999).
2. BİLGEHAN, H.: Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji Ve Bakteri İnfeksiyonları, 56-64, İzmir, (1996).
3. BAUMAN, R.W.: Microbiology, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, (2004).
4. FORBES, B.A., SAHM,D.F., WEISFELD, A.S.: Diagnostic Microbiology, Eleventh ed., Mosby, Inc., Philadelphia, US, (2002)
5. LEVINSON,W., JAWETZ, E.: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Altıncı Baskı, Güneş Yayınevi, Ankara, (2001).
6. KONNEMAN ELMER, W.: Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology, Fifth Edition, (1998).
7. AKAN, E.: Genel Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Çukurova Üniversitesi Tıp.Fak. Yayın No:16, Adana, (1992).

8. TUNÇKANAT, F.: Üriner Sistem İnfeksiyonu Patogenezinde Bakteriyel Virulans Faktörleri, Klimik Derg., 6 , (1993).
9. WALSH,C.: Antibiotics, First ed., ASM Pres,Washington, (2003)
10. ÜNAL, S.: Antibiyotik Kullanımının Sosyal Yönü, Ankem Dergisi, 17, 136-137. (2003)
11. YÜCE, A.: Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, Klimik Dergisi, 14, 41-46. (2001)
12. POMMERVILLE, J.C.: Alcamo's Fundamentals of Microbiology, Seventh ed., Jones and Barlett Publishers, The United States of America, (2004).
13. JACOBY, G., MUNOZ-PRICE, L.S.: Mechanisms of Disease The New  $\beta$ -Lactamases, The New England Journal of Medicine, 352, 380-391. (2005)
14. DOĞANAY, M., ÜNAL, S.: Hastane Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003.

15. AKTAŞ, F.: Nozokomiyal Pnömoni, Klimik Dergisi, 13, 3-6. (2000)
16. BİBEROĞLU, K., KILINÇ, O., ÇAKIR, N., ÇALANGU, S., MORAL, A.R.: Hastane Kökenli Pnömoni: Tanı ve Tedavi Rehberi, Klimik Dergisi, 11, 11-16. (1998)
17. BONTEN, M.J., CHASTRE, J., CRAIG, W.A., FAGON, J.Y., HALL, J., JACOBY, G.A., KOLLEF, M.H., LUNA, C.M., MANDEL, L.A., TORRES, A., WUNDERINK, R.G.: Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia, Am J Respir Crit Care Med., 171, 388-416. (2005)
18. BRADFORD, P.: Extended-Spectrum-Beta-Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat, Clinical Microbiology Reviews, 14, 933-951. (2001)
19. POYART, C., MUGNIER, P., QUESNE, G., BERCHE, P., TRIEU-CUOT, P.: A Novel Extended Spectrum TEM-Type Beta Lactamase (TEM-52) Associated Decreased Susceptibility to Moxolactam in *Klebsiella pneumoniae*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 108-113. (1998)

20. AKOVA, M., Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Var, Ankem Dergisi, 18, 97-103. (2004)
21. TENOVER, F. C., MOHAMMED, M.J., GORTON, T. J., DEMBEK, Z. F.: Detection of Organisms Producing Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Survey of Laboratories in Connecticut, Journal of Clinical Microbiology, 37, 4065-4070. (1999)
22. BUSH, K., JACOBY, G.: Nomenclature of TEM  $\beta$ -Lactamases, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 39, 1-3. (1997)
23. FAUSTIN, N., JUREEN, R., HARTHUG, S., URASSA, W., LANGELAND, N.: Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases Among Gram-Negative Bacteria of Nosocomial Origin from an Intensive Care Unit of a Tertiary Health Facility in Tanzania, BMC Infectious Diseases, 5:86, 1471-2334 (2005)
24. PATERSON, D., BONOMO, R.A.: Extended-Spectrum-Beta-Lactamases: a Clinical Update, Clinical Microbiology Reviews, 18, 657-686. (2005)
25. RICE, L.: Evolution and Clinical Importance of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases, Chest, 119, 391-396. (2001)

26. LIVERMORE, D., BROWN, D.F.J.: Detection of  $\beta$ -Lactamase-mediated Resistance, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 59-64. (2001)
27. BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A.: A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 1211-1233. (1995)
28. GÜR, D. : B-Laktamazların Sınıflandırılması, Flora, ; 2, 80-86, (1996).
29. PATERSON, D., HUIJER, K.M., HUIJER, A.M., YEISER, B., BONOMO, M.D., RICE, L.B., BONOMO, R.A.: Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3554-3560. (2003)
30. HASMAN, H., ÇETİN, B.: Nozokomiyal Enfeksiyon Etkeni Mikroorganizmalarda Antibakteriyel Direnç, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 35, 67-73. (2005)

31. JASSER, A.: Extended-Spectrum-Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem, Kuwait Medical Journal, 38, 171- 185. (2006)
32. HERITAGE, J., M'ZALI, F.H., BINZI, D.G., HAWKEY, P.M.: Evolution and Spread of SHV Extended Spectrum Beta Lactamases in Gram-negative Bacteria, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 44, 309-318. (1999)
33. MULVEY, M.R., BRYCE, E., BOYD, D., OFNER-AGOSTINI, M., CHRISTIANSON, S., SIMOR, A.E., PATON, S.: Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase- Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Canadian Hospitals, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 1204-1214. (2004)
34. <http://www.lahey.org/Studies/>
35. VAHABOĞLU, H.: Clinical Importance of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (PER-1-Type)- Producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains, J. Med. Microbiol., 50, 642-5. (2001)
36. GÜR, D.:  $\beta$ -Laktamazlar, Hacettepe Tıp Dergisi, 33,102-109. (2002)

37. ESSACK, S.Y.: Laboratory Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs)- The Need for a Reliable, Reproducible Method, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 37, 293- 295. (2000)
38. BAKER, C.N., STOCKER, S.A., CULVER, D.H., THORNSBERRY, C.: Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria, Journal of Clinical Microbiology, 29, 533-538. (1991)
39. PATERSON, D., KO, W.C., GOTTBURG, A.V., CASELLAS, J.M., MULAIZIMOGLU, L., KLUGMAN, K.P., BONOMO, R.A., RICE, L.B., McCORMACK, J.G., YU, V.L.: Outcome of Cephalosporin Treatment for Serious Infections Due to Apparently Susceptible Organisms Producing Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory, Journal of Clinical Microbiology, 39, 2206-2212. (2001)

40. CHANAWONG, A., M'ZALI, F.H., HERITAGE, J., LULITANOND, A., HAWKEY, P.M.: Characterisation of Extended Spectrum Beta Lactamases of the SHV Family Using Combination of PCR- Single Strand Conformational Polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), FEMS Microbiology Letters, 184, 85-89. (2000)
41. DAFFONCHIO, D., BORIN, S., CONSOLANDI, A., SORLINI, C.: Restriction Site Insertion-PCR (RSI-PCR) for Rapid Discrimination and Typing of Closely related Microbial Strains, FEMS Microbiology Letters, 180, 77-83. (1999)
42. HALIASSOS, A., CHOMEL, J.C., BAUDIS, M., KRUH, J.: Modification of Enzymatically Amplified DNA for The Detection of Point Mutations, Nucleic Acids Research, 17. (1989)
43. KWOK, S., KELLOG, D.E., MCKINNEY, N., GODA, K.: Effects of Primer-Template Mismatches on the Polymerase Chain Reaction: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Model Studies, Nucleic Acids Research, 18. (1990)
44. DURMAZ, R.: Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Adana, (2001).

45. ABBASOĞLU, U., ÖZÇELİK, B., ÖZKAN, S., ÜLKÜER, M.K.,  
KAYNAK, F.: Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı, Ankara.  
(2005)
46. AKÇAM, F.Z., GÖNEN,İ., KAYA, O., YAYLI, G.: Hastane  
Enfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta Laktam Antibiyotiklere  
Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması, Süleyman Demirel  
Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11, 6-9. (2004)
47. BAGATTINI, M., CRIVARO, V., POPOLO, A., GENTILE, F.,  
SCARCELLA, A., TRIASSI, M., VILLARI, P., ZARRILLI, R.:  
Molecular Epidemiology of Extended Spectrum Beta Lactamase-  
Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit,  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 979- 982. (2006)
48. EISEN, D., RUSSEL, E.G., TYMMS, M., ROPER, E.J.,  
GRAYSON, M.L., TURNIDGE, J.: Random Amplified Polymorphic  
DNA and Plasmid Analyses Used in Investigation of an Outbreak of  
Multiresistant *Klebsiella pneumoniae*, Journal of Clinical Microbiology,  
33, 713-717. (1995)

49. KOLAR, M., LATAL, T., CERMAK, P., BARTONÍKOVÁ, N., CHMELAROVÁ, E., SAUER, P., KESSELOVA, M.: Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Czech Republic, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 49-53. (2006)
50. BABINI, G., LIVERMORE, D.: Are Beta Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2230. (2000)
51. JUNGMIN, K., LEE, H.J.: Rapid Discriminatory Detection of Genes Coding for SHV  $\beta$ -Lactamases by Ligase Chain Reaction, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1860-1864. (2000)
52. GNIADKOWSKI, M.: Outbreak of Ceftazidime- Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric Hospital in Warsaw, Poland: Clonal Spread of the TEM-47 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)- Producing Strain and Transfer of a Plasmid Carrying the SHV-5-Like ESBL- Encoding Gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 3079-3085. (1998)

53. CHANAWONG, A., M'ZALI, F.H., HERITAGE, J., LULITANOND, A., HAWKEY, P.M.: Discrimination of SHV  $\beta$ -Lactamase Genes by Restriction Site Insertion-PCR, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45,2110-2114. (2001)

## **ÖZGEÇMİŞ**

1982 yılında Kozan’da doğdum. İlkokul eğitimimi Bursa, ortaokul ve lise eğitimimi Ankara’da tamamladım. 2000 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım ve 2004 yılında biyolog ünvanı alarak mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2005 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Halen aynı Anabilim Dalı’nda görevime devam etmekteyim.