

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli*'de Genişlemiş
Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Tekniklerle
Belirlenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mürvet Aksöz

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Melahat Kurtuluş Ülküer

ANKARA
EKİM 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli*'de Genişlemiş
Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Tekniklerle
Belirlenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mürvet Aksöz

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Melahat Kurtuluş Ülküer

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından SBE- 02/2008-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
EKİM 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 02/10/2009

Prof. Dr. Ufuk Abbasoğlu
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aykut Mısırlıgil
Ankara Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. Melahat Kurtuluş Ülküer
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler Listesi	IV
Tablo Listesi	V
Semboller ve Kısaltmalar	VI

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1. Barsak Dışı <i>E. coli</i> Enfeksiyonları	5
2.1.2. Barsaklarda Oluşan <i>E. coli</i> Enfeksiyonları	6
2.2. Beta Laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları	7
2.3. Antibiyotik Direnci	11
2.3.1. Doğal Direnç	11
2.3.2. Kazanılmış Direnç	12
2.3.2.1. Plazmidler	14
2.3.2.2. Transpozonlar	14
2.4. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	15
2.5. Beta Laktamazlar	16
2.5.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması	17
2.5.2. Beta Laktamazların İsimlendirilmesi	23
2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar	23
2.6.1. Genel Özellikleri	23
2.6.2. GSBL Tipleri	25
2.7. GSBL Tanı Yöntemleri	30
2.7.1. GSBL Tarama Testleri	32
2.7.2. GSBL Doğrulama Testleri	33
2.7.3. Moleküler Yöntemler	34
2.8. GSBL'ların Epidemiyolojik Özellikleri	38
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	40

3.1. Gereçler	40
3.1.1. Laboratuvar Malzemeleri	40
3.1.2. Besiyerleri	41
3.1.3. Referans Antibiyotikler	41
3.1.4. Kimyasal Malzemeler	42
3.1.5. Örneklerin Seçilmesi	44
3.2. Yöntem	48
3.2.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	48
3.2.2. Fenotipik Doğrulama Testi	48
3.2.3. Moleküler Yöntem	50
3.2.3.1. DNA İzolasyonu	50
3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	50
3.2.3.3. AgaroZ Jel Elektroforezi	51
4. BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ	63
7. ÖZET	64
8. SUMMARY	65
9. KAYNAKLAR	66
10. ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

Şekil 1.	TEM-1'den köken alan bazı GSBL'lardaki aminoasit değişiklikleri	26
Şekil 2.	1075 bç uzunluğundaki blaTEM'in agaroz jeldeki görüntüsü	52
Grafik 1.	TEM tipi beta laktamaz enzimi saptanan izolatların izole edildiği kliniklere göre dağılımları	53
Grafik 2.	Yaş gruplarına göre TEM tipi beta laktamaz enzimi saptanan <i>E. coli</i> izolatlarının yüzdeleri	54
Grafik 3.	Poliklinik ve klinik kaynaklı <i>E. coli</i> izolatlarındaki TEM tipi beta laktamaz varlığının oransal dağılımı	55
Grafik 4.	<i>E. coli</i> izolatlarında cinsiyete göre TEM tipi beta laktamaz enziminin oransal dağılımı	56

TABLÖLAR

Tablo 1.	Beta laktam grubu antimikrobiyal ajanlar	8
Tablo 2.	Beta laktamazların sınıflandırılması ve genel özellikleri	22
Tablo 3.	GSBL tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değeri sınırları	32
Tablo 4.	GSBL saptanmasında kullanılan yöntemler	37
Tablo 5.	GSBL kaynaklı enfeksiyonlarda tanımlanmış risk faktörleri	39
Tablo 6.	<i>E. coli</i> suşlarının izolasyon kaynaklarına göre dağılımı	45
Tablo 7.	<i>E. coli</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı	46
Tablo 8.	<i>E. coli</i> izolasyonlarının yaş gruplarına göre dağılımı	47
Tablo 9.	<i>E. coli</i> suşlarının cinsiyete göre dağılımı	47
Tablo 10.	TEM tipi beta laktamaz varlığı tespit edilen <i>E. coli</i> izolatlarının kaynağına göre dağılımı.	57

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

CFU: Coloni Forming Unit

EMB: Eozin Metilen Mavisi

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller Hinton Broth

DNA: Deoksiribonükleik asit

ETEC: Enterotoksijenik *E.coli*

EPEC: Enteropatojenik *E.coli*

EHEC: Enterohemorajik *E.coli*

EIEC: Enteroinvazif *E.coli*

EAEC: Enteroagregatif *E.coli*

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

ATCC: American Type Culture Collection

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

bç: Baz çifti

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz

U.V: Ultraviyole

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda antimikrobiyal ajanlara karşı direnç giderek artmaktadır¹. Dirençli mikroorganizmaların giderek yaygınlaşmasının en önemli nedeni, antibiyotik kullanımındaki yanlışlıklardır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin sıklıkla, özellikle beta laktam antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı direnç sorunu yaratmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri izole edilen patojenler arasındadır.

Beta laktamazlar beta laktam ilaçlara karşı gelişen dirençte en önemli direnç mekanizmasıdır. Klavulanik asitle inhibe olan ve plazmid aracılığıyla taşınan bu enzimler *Enterobacteriaceae*'nın çeşitli türleri arasında transfer edilebildiklerinden klinikte çok önemlidir. Bu enzimlere Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) denir. Türler arasında aktarılabilmek özelliğinden dolayı, GSBL aracılığıyla gelişen direnç hastanelerde salgınlara neden olmaktadır. Yetersiz tedavi hastanın hastanede kalış süresinin uzamasına ve mortalite oranlarının artmasına yol açar². GSBL'ler çoğunlukla TEM ve SHV türevi enzimler; bazı oksasilini hidroliz eden (OXA) enzimler, CTX-M ve AMC-tip beta laktamaz enzimleridir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi beta laktamazlar hemen her tür Gram negatif bakteride çok yaygındır.

GSBL üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Çift disk difüzyon testi, vitek GSBL testi, E testi, MİK belirlenmesi, genetik yöntemler ve izoelektrik fokuslama (IEF) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri GSBL enzimlerinin ayırıcı tanımlanmasını sağlar.

Bu çalışmada çeşitli kaynaklardan sağlanan çift disk sinerji testine göre GSBL(+) olduğu belirlenmiş *E. coli* izolatlarında PZR'la TEM tipi direnç geninin varlığının araştırılması ve prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale gelmesidir. Antibiyotik direncini mikroorganizmalar çok çeşitli şekilde geliştirmektedirler. Hücre duvarlarını antibiyotiğin geçemeyeceği şekle değiştirerek, antibiyotiği parçalayacak enzimler üreterek, antibiyotiğin etki ettiği kısmı değiştirerek direnç geliştirmektedirler. Antibiyotik direnci son yıllarda hızla artmaya başlamış ve önemli toplumsal sorun haline gelmiştir. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarında tedavi başarısının azalacağı ve tedavi giderlerinin artacağı öngörülmektedir. Antibiyotik direncini arttıran en önemli neden yanlış antibiyotik kullanımıdır. Gereksiz antibiyotik kullanımı, yetersiz dozda ve/veya sürede antibiyotik kullanımı, gereğinden uzun süre antibiyotik kullanımı, gereğinden fazla dozda antibiyotik kullanımı gibi yanlış antibiyotik kullanımı antibiyotik direncinin artmasına neden olmaktadır. Eskiden normal flora üyesi olarak düşünülen zararsız mikroorganizmaların (Enterokoklar, pnömokoklar ve *E. coli*) ve çevremizde bulunan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi mikroorganizmaların patojen hale dönüşmesi direncin oluşmasına bağlıdır. İnsan normal florası deri, ağız, üst solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve genital sistem gibi çeşitli ekosistemlerden oluşur³. Antibiyotik tedavisi sadece hedefi olan patojenik bakterileri etkilemez, normal florayı da etkilemektedir. Antibiyotik tedavisi absorpsiyon derecesine, alınma yollarına ve ajanın spektrumuna bağlı olarak normal florada ekolojik karışıklığa neden olabilir⁴. Antibiyotiklerin kullanımı yenidoğanların intestinal kolonizasyon paternlerini etkiler. Beta laktam antibiyotikler ve gentamisinle tedavi, anaerobik bakterilerin (clostridia hariç) baskılanmasına, *Klebsiella*,

Enterobacter, *Citrobacter* ve *Pseudomonas* seviyelerinin artmasına ve *E. coli* düzeylerinin azalmasına neden olur⁵.

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia cinsi, *Enterobacteriaceae* familyasının bir cinsidir⁶. İnsan ve hayvanların barsaklarında yaygın olarak bulunan fırsatçı patojendir ve barsaktaki aerobik bakterilerin en baskın olanıdır⁷. *E. coli* 1885'de Alman pediatrist, Theodor Escherich tarafından 1885 yılında *Bacterium coli commune* adı ile tanımlanmış ve barsak dışı enfeksiyonlardaki patojenliği daha sonra açıklanmıştır. 1919'da Castellani ve Chamer tarafından *Escherichia* cins adı olarak kabul edilmiştir. Serogrup 0111 suşunun bir bakımevinde çocuklarda ishal salgınlarına yol açığının gösterilmesi ile barsak patojeni olan enteropatogenik *E. coli* (EPEC) suşu 1945'de tanımlanmıştır. 1969'da Orta Doğu'daki İngiliz askerlerindeki ishal olgularında enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) suşları, aynı yıllarda enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) suşları, 1982'de A.B.D'de salgında enterohematojenik *E. coli* (EHEC) suşları izole edilmiştir⁸.

E. coli, yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 1.0-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak basil görünümündedir⁷. Bazı kültürlerde koka benzer küçük ve kısa şekilde olabileceği gibi, bazı kültürlerde de normalden uzun ve hatta Y harfi şeklinde dallanan filamanlı şekiller halinde de bulunabilirler⁹. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve Gram negatiftirler. Bazı suşları kapsüllüdür. Basit besiyerlerinde kolay ürerler ve fakültatif anaerobturlar, en iyi üreme ısıları 37°C ve pH 7-7.2'dir. Glikoz, laktoz, trehaloz ve ksilozu fermente ederler. H₂S, üreaz veya fenilalanindeminaz oluşturmazlar^{7,9}.

Antijenik yapıları; *E. coli*'nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır⁷. *E. coli* Kauffman tarafından antijenik özelliklerine göre 1944 yılında sınıflandırılmıştır. 171 O antijeni, 50'nin üzerinde H antijeni ve 100'den fazla K antijeni tanımlanmıştır⁹. *E. coli* suşlarının antijen yapısının belirlenmesi, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır. *E. coli*'nin oluşturduğu çeşitli hastalık tabloları ile özel antijen tipleri arasında ilişkiler vardır. Örneğin serotip 057:H7, verotoksin oluşturur, hemorajik diyareye ve hemolitik üremik sendroma yol açar^{6,7}.

E. coli insan sindirim sisteminde normal barsak florasını oluşturan bakterilerdendir. Bu suşların çoğu patojen değildir. Barsaklarda diyare oluşturan suşlar dışında, kommensal olarak yaşarlar. Bazı *E. coli* suşları sindirim sistemi dışına (üreme sistemi, meninks ve kan gibi) çıktıklarında hastalıklara neden olur. Sindirim sistemi dışında enfeksiyon oluşturan *E. coli* suşları diğer *E. coli* suşlarından farklıdır; sindirim sistemi dışında canlı kalabilme ve yerleşebilme kapasitelerini arttırmak için spesifik virulans faktörleri ihtiva ederler¹⁰.

2.1.1. Barsak Dışında *E. coli* Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonu *E. coli*'nin neden olduğu en yaygın enfeksiyondur. Komplike olmayan üretrit, sistit, pyelonefrit'e neden olur. *E. coli* ile oluşan komplike olmayan enfeksiyonlar, kadınlarda sık görülür. Komplike üriner sistem enfeksiyonuna katkıda bulunan en önemli konak faktörü, normal üriner akımın tıkanmasına yol açan, prostat hipertrofisi, taş, konjenital anomaliler gibi nedenler ve sonda gibi yabancı cisimlerin varlığıdır. Komplike olmayan enfeksiyon için özgün virulans faktörlerine gerek vardır. Bunlardan en önemlisi P fimbria'dır. Üroepitelyal hücrelerin %99'unda P kan grubu antijeni vardır. P fimbriyası P kan grubu antijenlerine

bağlanır. P fimbria'ya pap pili yani pyelonefrit ile ilişkili pili de denir. *E. coli*'nin O4, O6, O7, O75 serotipleri hemolizin üretmeleri ve üriner sistem epiteline bağlanma gibi özellikleri nedeniyle en sık üriner sistem enfeksiyonu oluşturan etkenlerdir.

Yeni doğan menenjit, K1 kapsül antijeni taşıyan *E. coli* suşları tarafından oluşturulur. *E. coli* fırsatçı bir patojendir ve diğer fırsatçı patojenlerde olduğu gibi primer enfeksiyon bölgesinden kana karışarak bakteriyemi yapabilir. Bu primer odak genellikle üriner veya gastrointestinal sistem olmakla beraber *E. coli* ile enfekte olmuş çeşitli yaralar ve peritonitler de olabilir. Ayrıca nozokomiyal sepsis ve endotoksik şoka da yol açabilirler. Solunum yolu enfeksiyonlarından, hastane kaynaklı pnömonilerde %12-50 oranında *E. coli* etkendir⁷.

2.1.2. Barsaklarda Oluşan *E. coli* Enfeksiyonları

Barsaklarda hafif diyare, kolera benzeri ağır sıvı kayıplarıyla seyreden diyare, ya da beraberinde hemolitik üremik sendrom gibi hayatı tehdit eden komplikasyonları olan kanlı diyare gibi gastrointestinal hastalıklara beş farklı *E. coli* grubu (ya da virotipi) neden olmaktadır.

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Gelişmekte olan ülkelerde iki yaşın altındaki çocuklarda görülen bakteriyel diyare ve turist diyaresinin en önemli etkenidir. ETEC, plazmid tarafından kodlanan ısıya duyarlı (LT) ve ısıya dirençli (ST) olmak üzere iki toksin üretir. LT, kolera toksinine benzer.

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): Bebek ve küçük çocuklarda ağır ve uzun süren kansız diyare kusma ve ateş ile karakterizedir. Hastanelerde, bebek servislerinde ve kreşlerde salgınlara yol açar. EPEC

hücreleri ince barsak mukoza hücrelerini enfekte eder ve mikroviluslarda yapısal bozukluklara ve karakteristik lezyonların oluşumuna neden olur. Biri bakteriyel kromozom diğeri plazmid tarafından kodlanan iki adezyon molekülü tanımlanmıştır^{6,7}.

Enteroinvazif *E. coli* (EIEC): Direkt kolon mukozasına invazyon yapar, epitel hücreleri içinde çoğalır, epitel hücrelerini tahrip eder. *Shigella*'ların yaptığı dizanteri gibi enterit oluşturur. EIEC suşlarının çoğu hareketsiz ve laktoz negatif veya geç pozitifdir.

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): Kanlı diyare ve hemolitik üremik sendroma yol açar. Su ve gıda kaynaklı enfeksiyonlardır. EHEC suşları lizojen bir bakteriyofaj tarafından kodlanan, vero hücrelerine toksik etki gösteren, protein sentezini inhibe eden, Shigatoksin benzeri verotoksin salgılar.

Enteroagregatif *E. coli* (EAggEC): İnvazyon ve inflamasyona yol açmaksızın, O ve H antijenlerine göre EPEC, ETEC, EIEC veya EHEC virotiplerinden olmayan, Hep-2 ve HeLa hücrelerine tipik olarak tutunan *E. coli* suşlarını tanımlar⁷.

2.2. Beta Laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Günümüzde beta laktam antibiyotikler; gerek hastane içinde, gerekse hastane dışında en sık kullanılan antibiyotiklerin başında gelmektedir. Beta laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanır¹¹ (Tablo1). 1. Penisilinler 2. Sefalosporinler, 3. Monobaktamlar, 4.Karbapenemler, 5. Beta laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam)¹².

Tablo 1: Beta laktam grubu antimikrobiyal ajanlar¹¹.

Beta-laktam grublar	Antimikrobiyal ajanlar
Penisilinler	Penicillin G, penicillin
	Penicillinase resistant penicillin: methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin
	Aminopenicillin: ampicillin, amoxicillin
	Carboxypenicillin: carbenicillin, ticarcillin
	Ureidopenicillin: mezlocillin, piperacillin
Sefalosporinler	Birinci jenerasyon: cefazolin, cephalothin, cephalexin
	İkinci jenerasyon: cefuroxime, cefaclor, cefamandole, cefamycins (cefotetan, cefoxitin)
	Üçüncü jenerasyon: cefotaxime, ceftriaxone, cefpodoxime, ceftizoxime, cefoperazone, ceftazidime
	Dördüncü jenerasyon: cefepime, cefpirome
Karbapenemler	Imipenem, meropenem, ertapenem
Monobaktamlar	Aztreonam

Beta laktam halkası biri azot, üçü karbon olan 4 üyeli doymuş heterosiklik bir halkadır¹³. Peptidoglikan zincirlerle çapraz bağlanmayı sağlayan Penisilin Bağlayan Protein (PBP) enzimlerine bağlanırlar.

Beta laktam antibiyotikler, bakteride hücre duvarının majör polimeri olan peptidoglikan sentezini inhibe ederek etki eder. Gram negatif bakterilerde sitoplazmik membranı saran bir periplazmik boşluk ve takiben peptidoglikan tabakası bulunur. En dışta ise dış membran yer alır¹³. Peptidoglikan tabakası ard arda dizilmiş N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAMA)'ın alternatif olarak yer aldığı iplikçiklerden oluşmaktadır. Her iplikçikte NAMA bağlı dört amino asitten oluşan tetrapeptid zinciri bulunur. Bu tetrapeptid zincirleri de diğer iplikçiklerdeki peptid zincirlerle çapraz bağlanarak peptidoglikanın kafes şeklinde bir yapı oluşturmasını sağlar¹⁴.

Hücre duvarının sentezinde rol oynayan otuz kadar enzim vardır, ancak yapı üniteleri olan çapraz peptid bağlarının oluşması için üç enzim sistemine gereksinim vardır. Bunlardan transpeptidazlar yan yana sıralanan peptidoglikan zincirlerinde NAMA bağlı pentapeptidlerle L-lizin ile D-alanin arasında peptid bağı oluşmasını, karboksipeptidazlar ise bu pentapeptidin son D-alanin molekülünün uzaklaşmasını sağlar. Diğer enzim grubu ise endopeptidazlardır. Bu enzimler sitoplazma zarında bulunur.

Beta laktam antibiyotiklerde, beta laktam halkasının üç boyutlu konumu NAMA bağlı pentapeptidin ucundaki D-alanin-D-alanine benzer. Ortamdaki beta laktam antibiyotik Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakayı kolayca geçer, Gram negatif bakterilerde ise dış

duvardaki porin kanallarından geçip periplazmik aralığa erişir, benzerlik nedeniyle enzimler D-alanin yerine beta laktam antibiyotiğe bağlanır. Bu nedenle de enzimler PBP olarak adlandırılır ve beta laktam antibiyotikle bağlanınca fonksiyonlarını göremez ve hücre duvarı sentezlenemez. Bir bakteride çok sayıda PBP bulunur. Bu enzimler moleküler ağırlıklarına göre; PBP-1, PBP-2, PBP-3 olarak gösterilir. Ara ağırlıkta olan PBP'ler PBP-1a, PBP-1b olarak adlandırılır. Çeşitli beta laktam antibiyotiklerin bir bakterinin PBP'lerine afinitesi farklıdır. Bu nedenle beta laktam antibiyotiklerin farklı bakterilere etkinliği de farklıdır. Beta laktam antibiyotikler bu enzimlerle, özellikle transpeptidazlarla bağlanıp onları bloke ederek etki gösterdiklerinden hücre duvar sentezi yapılan, yani çoğalmakta olan bakterilere etkilidir ve bakterisid etki gösterirler. Bu etki sonunda bakteriler erir (lisis). Bu erimede bakterinin otolizinleri (hidrolitik enzimler) rol oynar. Beta laktamlar otolizin inhibitörlerini bloke ederek otolizinlerin etkinliğini arttırırlar. Hücre duvar sentezi yapılan bakteride otolizinler, peptidoglikan zincirlerin arasındaki bağları arak büyüyen hücrelerde hücre duvarına yeni peptidoglikan zincirlerin girmesine olanak sağlar ve hücre duvarı sentezinde transpeptidazlarla birlikte fonksiyoneldirler¹².

Gram negatif bakterilerde beta laktam antibiyotiklerin etkinlik göstermeleri için porin (Outer Memran Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanallarından geçerek hedeflerine bağlanmaları ve sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta laktamazlardan etkilenmemeleri gereklidir¹⁵.

Beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen bakteri direncinde, beta laktam halkasını hidrolize ederek antibiyotiklerin etkisiz kalmasında, bakterinin beta laktamaz enzimlerinin rolü büyüktür. Bir beta laktamaz molekülü çok sayıda antibiyotik molekülünü hidrolize edebilir. Beta

laktamaz inhibitörü denilen moleküller (başlıca klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam), beta laktam halkası içerdiğinden, beta laktamaz enzimleri ile geri dönüşümsüz birleşir ve hem enzim molekülü hem kendisi inaktif hale gelir. Bu şekilde çok sayıda beta laktam antibiyotik molekülünü hidrolize edebilecek beta laktamaz enzimi bloke olur ve beta laktamaz inhibitörü ile birlikte verilen beta laktam antibiyotik korunarak etkisini göstermesi sağlanır. Bu inhibitörlerin kendi başlarına bakterilere etkileri çok azdır; bu nedenle tedavi amacıyla değil ancak beta laktam antibiyotiklerle kombine edilerek, antibiyotiği beta laktamaz enzimlerinin etkisinden korumak için kullanılır (örneğin, amoksisilin+klavulanik asit gibi)¹².

2.3. Antibiyotik Direnci

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde genel olarak iki genetik mekanizma önemlidir; doğal direnç (intrinsik) ve kazanılmış direnç (kalıtsal).

2.3.1. Doğal Direnç (İntrinsik)

Bir mikroorganizma türünün genetik özeliği olan direnci tanımlar. Bir organizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu anlamına gelir. Mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşıyamaları veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşmasını önleyen doğal engellere sahip olması ile ortaya çıkan dirençtir. Gram negatif bakteriler vankomisine, enterokoklar sefalosporinlere ve hücre duvarı olmayan Mycoplasmalar beta laktam antibiyotiklere, uygun hedef yapıları bulundurmadiğundan doğal olarak dirençlidir. Aynı cins/türün tüm üyeleri aynı doğal dirence sahiptir.

2.3.2. Kazanılmış Direnç (Kalıtsal)

Bakterilerin genomundaki değişimlere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir antimikrobiyal ajana dirençli hale gelmesidir. Bakteri popülasyonu antimikrobiyal madde ile ilk karşılaştığında mikroorganizma üzerinde etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobiyal maddeye karşı direnç gelişir ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkar ve yayılım gösterir¹⁷.

Kazanılmış direnç; mutasyonlar, yatay gen transferleri, plazmidler ve hareketli genetik elementler aracılığıyla gerçekleşir.

Mutasyonlar: Mutasyonlar kendiliğinden oluşabilir ve bakteriyel genomdaki herhangi bir geni etkileyebilir. Mutasyon frekansı genler arasında değişebilir. Çoklu mutasyonlar hedef gende antibiyotik direnci oluşturan mutasyonlardır¹⁸. Antibiyotik direncine neden olan mutasyonlar antibiyotiğe bağlı olarak değişir. Streptomisin, nalidiksik asit ve rifampin direncini oluşturan mutasyonlar vankomisin direnci oluşturan mutasyonlardan daha yaygındır¹⁹.

Yatay gen transferi: Kazanılmış dirençte en yaygın mekanizma direnç genlerinin yatay kazanımıdır. Yatay gen transferi sayesinde, aynı veya yakın direnç genleri farklı tür ve cinslerde bulunabilir^{20,21}.

Bakteriler arasında doğal gen transferleri başlıca üç mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Konjugasyon: Verici hücre DNA'sının tümünün veya bir segmentinin, iki hücrenin doğrudan teması veya seks pilusları aracılığı ile alıcı hücreye aktarılmasıdır. DNA'yı veren hücreye F^+ , alıcı hücreye F^- denir. F^+ suşunda F pilisini kodlayan genleri bulunduran F plazmidi vardır. F plazmidindeki *tra* gen bölgesi F pilisi kodlar. Verici hücre F pilusu ile temas sağlar ve hücreler arasında kanal oluşur. Plazmidteki *oriT* (transferin başlama yeri) bölgesinde bir kesik oluşur, verici plazmid DNA'nın yeni bir kopyasını sentezlemeye başlar. Plazmidin eski kopyası alıcı hücreye tek iplikli DNA molekülü olarak aktarılır²².

Transformasyon: Bir bakteri hücresinin genotipinde çevreden alınan serbest bir yabancı DNA ile değişiklik oluşması demektir. Transformasyonda verici hücre genellikle lizise uğrar ve DNA'sını dış ortama bırakır. Bu serbest DNA'nın bazıları alıcı hücrelerce alınır. Bu işlem in vitro şartlarda plazmidlerin konakçı bakteriye katılmasında kullanılır. Pönomokoklar çevreden serbest DNA'yı alarak direnç kazanmalarına rağmen in vitro direnç genlerinin transferinde önemleri azdır²³.

Transdüksiyon: Bakteri DNA'sının faja katılması ve virusler aracılığıyla yeni bakterilere aktarılmasıdır. Bakteriyofajlar (bakteri virüsleri) dirençli plazmidin taşıyıcılığını (vektörlüğünü) yapar. Bakteri içine giren bakteriyofaj R plazmidini, viral protein kılıfı içine alır ve bölünerek plazmidin kopyasını içeren çok sayıda yavru bakteriyofaj oluşur. Sonuçta bakteri hücresi patlar ve ortama R plazmidi içeren yüzlerce yeni bakteriyofaj saçılır. Bunlarda aynı veya farklı türden diğer bakterileri enfekte ederek ve onları dirençli duruma getirirler. Transdüksiyon mekanizması, beta laktamaz geninin stafilokoklara aktarılarak direnç kazanılmasında önemlidir²⁴.

Konjugasyon çoğunlukla bakteriler arasında direnç genlerinin transferinden sorumludur. Transfer plazmidler ve transpozon gibi hareketli genetik elementlerle gerçekleşir.

2.3.2.1. Plazmidler

Plazmidler otonom olarak replike olan 1500-400.000 bp büyüklüğünde ekstrakromozomal elementlerdir. Bir hücrede küçük plazmitlerin sayısı 20 iken büyük plazmidler tek kopyadır. Plazmidler canlılığın sürdürülmesinde gerekli olmayan, ancak bakteri için faydalı genler taşır. Bu genler antibiyotik direnci, metabolik fonksiyonlar ve virulans faktörleri gibi genlerdir²⁵.

2.3.2.2. Transpozonlar

Transpozonlar; genomda kromozomdan plazmide ve plazmidten kromozoma transfer olan DNA dizileridir. Transpozonların replikasyon sistemi olmadığından kromozom veya plazmidlerle birleşme özelliği vardır. Sadece konjugatif transpozonlar bir hücreden diğerine hareket etme yeteneğini DNA'larından bağımsız yapabilir ve dairesel çift iplikli form oluştururlar²⁷. Sonra ipliklerden biri diğer hücreye geçer ve kromozom veya plazmide katılır²⁸. Transpozon merkezinde antibiyotik direncini sağlayan genler vardır. En yaygın basit transpozon insersiyon dizileridir (IS) ve transferleri için gerekli genleri kodlar. İnsersiyon dizilerinin uçlarında inverted dizilerle çevrilmiş bölgenin arasında transpozaz enzimini kodlayan bölge vardır. Transpozaz genlere giriş-çıkış işlemlerini; transpozonun yeni bir kromozoma veya plazmide katılmasını ve ayrılmasını sağlar.

2.4. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Beta laktam ajanlar kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan ve hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara bağlanarak etkilerini gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotik grubudur³⁰.

1-Hücre içinde beta laktam antibiyotik konsantrasyonunun azalması: Bu mekanizma ilacın hücre içine alımının azalmasını veya hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sisteminden kaynaklanır.

a-Girişin kısıtlanması (porin kaybı): Hücre zarının geçirgenliğinin azalması Gram negatif bakteriler için özellikle önemlidir. Gram negatif bakterilerde beta laktam antibiyotikler, dış membrandaki outer membrane protein (OMP) adı verilen porlar yolu ile hücreye girmektedir. Beta laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca iki kanal aracılığıyla geçer. Bu porin sistemlerinden MexA, MexC, MexD, OprJ, MexB ve OprM sistemi imipenem dışındaki birçok beta laktama direnç oluşturmaktadır³¹.

b-İlacın dışarı atılması (efflux mekanizması): Aktif effluks veya porin proteinlerindeki mutasyon nedeniyle geçirgenliğin azalması bakterilere direnç kazandırır. Bu iki mekanizma Gram negatif bakterilerde direnç oluşturan ikinci önemli mekanizmadır³².

2-Hedef bölgesinde (PBP) değişimi: Beta laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi olan PBP'lerde mutasyonlar sonucu oluşan değişiklikler; PBP'nin beta laktam antibiyotiğe afinitesinin azalmasına (ya

da kaybolmasına), PBP sayısının azalmasına veya beta laktam antibiyotiklere düşük afinite göstermesine veya afinitesi düşük yeni PBP'lerin sentezlenmesine neden olur. *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*'da gözlenen penisilin direnci ve metisiline dirençli *S. aureus*'da gözlenen direnç PBP'lerdeki değişikliklerle oluşmaktadır. Bu tür direnç, Gram pozitif koklarda direncin oluşmasında çok önemli bir mekanizma olmasına karşın Gram negatif bakterilerde nadirdir³³.

3-Beta laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi;

- a. Beta laktamaz üretiminin artması,
- b. Beta laktamaz yapısının modifikasyonu,
- c. Farklı spektrumlu yeni beta laktamazların üretimi.

Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağı parçalayarak beta laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir^{12,34}. Bu mekanizma Gram negatif enterobakterilerde beta laktam direnç mekanizmalarının en yaygın olanıdır.

2.5. Beta Laktamazlar

Beta laktamazlar; Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram pozitif bakteriler arasında beta laktamaz üreten en önemli patojen *Staphylococcus spp.*'dir. Stafilokoksik beta laktamazlar özellikle penisilini hidrolize eder. *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta laktamazları esas olarak penisilini

parçalamaktadır. *Bacteriodes spp.*'ler tarafından üretilen beta laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinaz etkinliği göstermektedir³⁵.

Gram negatif bakterilerde ilk plazmid kaynaklı beta laktamaz 1960'lı yılların başında tespit edilmiştir. TEM-1 olarak isimlendirilmiş olan bu enzim Yunanistan'da Temonieri isimli bir hastanın kan kültüründen izole edilmiş olan *E. coli* suşundan elde edilmiştir. Plazmid ve transpozonların denetiminde olan TEM-1 beta laktamaz hızla diğer türlere ve birkaç yıl içinde de tüm dünyaya yayılmıştır. Beta laktamazların, kromozomal genlerin yanı sıra plazmid ve transpozonlarca da kodlanabilmesi hızla yayılmalarına katkıda bulunmaktadır³⁶. *Klebsiella*'la da plazmid kaynaklı bir beta laktamaz SHV-1 (sulfhydryl variable) 1974'de Piton tarafından tanımlanmıştır³⁵.

2.5.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması

1978'ten sonra birçok yeni beta laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile eş zamanlı olarak beta laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir³⁷. Buna bağlı olarak bu enzimlerin gruplandırılması gerekli görülmüş ve farklı zamanlarda birçok sınıflandırma şeması önerilmiştir^{38,39}. Yaygın olarak kabul gören ilk sınıflandırma şeması, Richmond ve Sykes tarafından 1973 yılında substrat profiline göre yapılmış ve beta laktamazlar beş gruba ayrılmıştır³⁵. Matthew ise izoelektrik odaklama yöntemine göre sınıflama yapmıştır. Nükleotid dizilerine dayalı moleküler düzeydeki sınıflamanın ilk temellerini ise 1980 yılında Ambler yapmıştır. Ambler sınıflandırılmasında; beta laktamazlar, A, B, C ve D olmak üzere 4 sınıfa ayrılır. A, C ve D sınıfları, aktif bölgelerinde bir serin aminoasiti bulunan enzimlerdir. B sınıfı beta laktamazlar ise, kofaktör olarak çinko iyonu gereksinen metalloenzimlerdir.

1989'da Bush biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırmıştır. Beta laktamazların en yaygın sınıflandırılması Bush-Jacoby-Medeiros grublandırmasıdır. Bu sınıflandırma, substrat profillerine ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık ve fiziksel özellikleri temel alınarak 1995 yılında Bush-Jacoby-Medeiros tarafından yapılmış ve beta laktamazlar dört gruba ayrılmıştır⁴⁰.

Grup 1 (Ambler C Sınıfı) Beta Laktamazlar:

Bu gruptaki enzimler beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidir ve çoğunlukla kromozomal genler tarafından kodlanır. Bakteri beta laktam antibiyotikle karşılaştığında, kromozomal olarak kodlanan enzimlerin sentezi artar. Bu tür enzimlere indüklenebilen beta laktamazlar da denir. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler. Birinci grup enzimler daha sık *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa*' da bulunmaktadır⁴¹.

Grup 2 (Ambler A-D Sınıfı) Beta Laktamazlar :

İlk saptanan Grup 2 enzimleri ampisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere etkili iken ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere etkisizdir. Ancak zamanla bu enzimlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu monobaktam ve üçüncü kuşak sefalosporinlere de etkili olan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ortaya çıkmıştır⁴². En geniş kategoriyi oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Moleküler sınıflandırmada; beta laktamazların çoğunluğu; A ve D sınıfında yer almaktadır. Bu beta laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre altı alt gruba ayrılır³⁹. 2b, 2be ve

2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar⁴⁰.

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *S. aureus*'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *B. cereus*'un kromozomal beta laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır⁴⁰.

2b: Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta laktamazları içerir¹⁵. Plazmid kontrolündeki "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta laktam antibiyotiklere direnç oluşturdıklarından geniş spektrumlu denmiştir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta laktamazları *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca OHIO-1 ve *H. influenzae*'da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedir. Özellikle *E. coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülen TEM-1 beta laktamaz'dır. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K. pneumoniae* suşlarında bulunur⁴³.

2be: Oksiimino beta laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) etki eden yeni TEM- ve SHV- enzimleri gelişmiştir⁴⁴. Bunlar grup 2be'de yer almakta

ve ESBL (extended-spectrum beta-lactamase =genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar) olarak adlandırılır. Bu enzimi içeren izolatlar seftazidime çok dirençli iken seftadizim klavulanata çok duyarlıdır. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir.

2br: Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar bu gruba alınmıştır. TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır.

2c: Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V. cholerae*'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır.

2d: Bu grup, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suшта saptanmıştır⁴⁵. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidir. Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır.

2e: Bu grupta yer alan beta laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *B.fragilis*'in CepA enzimi, *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 ve *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır⁴⁰.

2f: Bu grupta, *E. cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S. marcescens*'in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır⁴⁰.

Grup 3 (Ambler B sınıfı):

Bu grup, moleküler sınıf B'de yer alan metallo beta laktamaz (MBL) enzimlerinden oluşur. Monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta laktamları hidroliz edebilir. Klavulanik asit veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmaz, EDTA ile inhibe olurlar. Aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu grup beta laktamazlar a,b,c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar⁴⁰.

Grup 4:

Bu grup, klavulanik asit ile iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan oluşur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül 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 laktamazı ve *Pseudomonas cepacia*'daki beta laktamazlar bu gruba dahildir.

Tablo 2: Beta laktamazların sınıflandırılması ve genel özellikleri⁴⁶

Bush (1989)	Ambler (1980)	Richmond Sykes (1968-73)	Tercih edilen substrat	Klavulanik asit etkisi	Örnek enzimler
1	C	Ia, Ib, Id	Sefalosporinler	-	Gram negatif bakterilerdeki AmpC enzimleri MIR-1
2a	A	-	Penisilinler	+	Gram pozitif bakterilerdeki penisilinazlar
2b	A	III	Penisilinler, Sefalosporinler	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2b	A	-	Penisilinler, Dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, Monobaktamlar	+	TEM 3-26, SHV 2-6, <i>K. oxytoca</i> K1
-	A	-	Penisilinler	+ / -	TEM 30-36, TRC-1
2c	A	II-V	Penisilinler Karbenisilin	+	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	V	Penisilinler	+	OXA 1-11, PSE-2
			Kloksasilin	-	
2e	A	Ic	Sefalosporinler	+	İndüklenebilir sefalosporinazlar (<i>Proteus vulgaris</i>)
-	A	-	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	Sme-1, (<i>Serratia marcescens</i>)
3	B	-	Karbapenemler dahil bir çok beta laktam	-	L1, (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)
4	-	-	Penisilinler	-	Penisilinaz <i>Pseudomonas cepacia</i>)

2.5.2. Beta Laktamazların İsimlendirilmesi

Beta laktamazların isimlendirilmesindeki farklı yaklaşımlar, bu enzimleri gördüklerinden daha fazla karmaşık bir hale getirmiştir. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), genlerine göre (*Amp-C*, *CepA*), izole edildikleri bakterilere göre (AER, PSE), suşlara göre (P99), izole edildikleri hasta isimlerine göre (TEM, ROB), izole edildikleri hastaneye ve eyaletlere göre ya da bulan kişilere göre isim almışlardır. Bunlardan bazıları geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin, SHV, sulfhydryl variable'dan kısaltılmıştır, buna karşın artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sulfhydryl değil, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas*'dan izole edilmiş olan PSE enziminin enterobakterilerde de bulunabildiği bilinmektedir. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitor rezistan) gibi tanımlayıcı isimler verilmiş ve bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise, TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM 26, TEM 43 gibi numara ile belirtilmesidir^{47,48}.

2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

2.6.1. Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae familyası üyeleri yaygın olarak penisiline dirençli, ancak genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere direnç oluşturmeyen beta laktamaz kodlayan plazmidleri (TEM-1, TEM-2, ve SHV-1) bulundurlar. GSBL ilk kez 1983 yılında belirlenmiştir.

GSBL'in temel özelliği, oksiimino grubu içeren sefalosporinleri (seftazidim, seftriakson, sefotaksim, sefuroksim) ve monobaktamları (aztreonam) hidrolize etmesi ve sefamisinler (sefoksitin, sefotetan) ile karbapenemlere (imipenem, meropenem) duyarlı olmasıdır. Klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimlerdir⁴⁶.

Aktif bölgelerinde serin içerirler. Grup 2b'de yer alan ve penisilin türevleri ile dar spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları için bu şekilde adlandırılır^{46,49}. Bu enzimler, Ambler'in moleküler sınıflamasında grup A veya grup D içinde, Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasında, grup 2be ve 2d'de yer almaktadır. GSBL'lar klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Sefamisinler ve karbapenemler GSBL'lardan etkilenmezler. Bu enzimler çoğunlukla bakteri suşları ve türleri arasında aktarılabilen büyük plazmidlerde kodlanmaktadır^{38,46,49}. GSBL'lar başta *Klebsiella spp.* ve *Escherichia coli*'lerde daha sık bulunmakla birlikte *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* gibi birçok gram negatif bakteride bulunur^{38,46,50,51}.

GSBL'lar beta laktamazların aktif bölgesindeki aminoasitin konformasyonunun değişimi veya TEM-1, TEM-2, veya SHV-1 genlerindeki mutasyonlarla oluşurlar⁵². GSBL'in aktif bölgeleri köken aldıkları enzimlerden 1 ile 7 aminoasit değişik olabilir. Bu durum bu enzimlerin hidrolizine hassas beta laktam antibiyotiklerin spektrumunu genişletir. Bunlar aktif bölgeyi genişleterek enzimin oksiimino yan zinciri içeren beta laktamlar ile etkileşime girmesini kolaylaştırır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar köken aldıkları TEM-1, TEM-2 ve SHV-1

enzimlerinden farklı olarak, oksimino grubu içeren beta laktamları da hidroliz ederler³⁸.

GSBL'ların büyük çoğunluğu, özellikle TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL'da mevcuttur. Şimdiye dek tanımlanan GSBL'ların sayısı 200'ü aşmıştır^{38,46}.

2.6.2. GSBL Tipleri

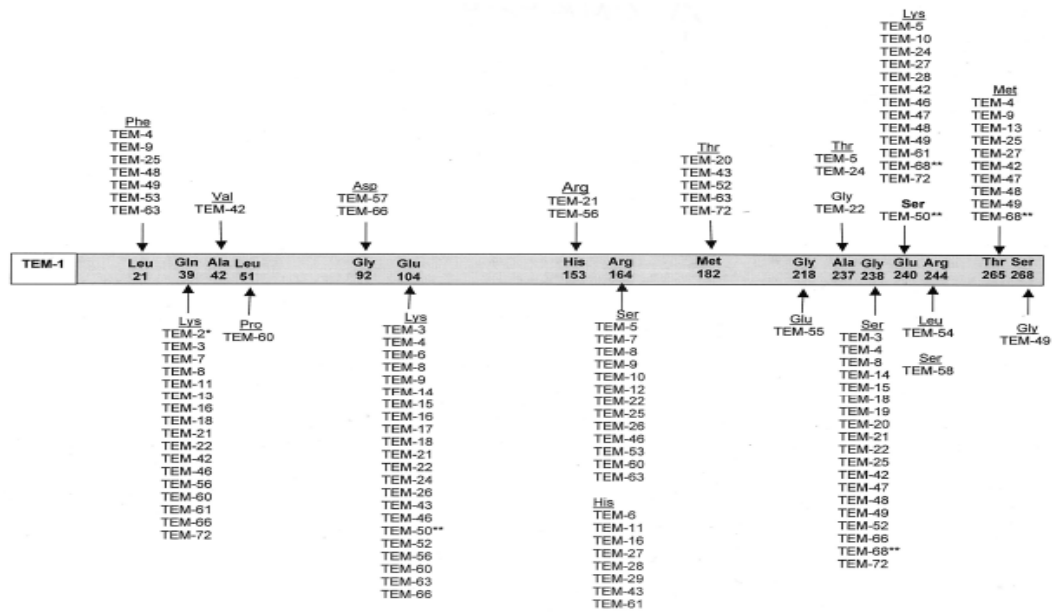
GSBL'ların büyük çoğunluğu TEM veya SHV enzimlerinden köken almıştır. Günümüzde TEM türü beta laktamazların sayısı 150'yi, SHV türü beta laktamazlar 100'ü geçmiştir. Bugüne kadar tanımlanmış olan TEM, SHV ve OXA genişlemiş spektrumlu ve inhibitör-rezistans beta laktamazlar ve bunların aminoasit değişiklikleri <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> adresinde güncellenmektedir^{38,46}.

TEM Grubu

TEM-1 Gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisilin, penisilin ve 1.kuşak sefalosporin direncine neden olur. Bu enzim TEM-1'in üretimi nedeniyle *E. coli*'deki ampisilin direncinin %90'nından sorumludur^{38,49}. TEM-1 ve TEM-1'in yapısındaki bir aminoasit değişikliği; 39. pozisyonadaki glutamin yerine lizinin geçmesi sonucu oluşan TEM-2 enzimleri dar spektrumlu enzimlerdir, oksimino sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. Ancak 12 farklı pozisyonda oluşan aminoasit değişiklikleri günümüzde 150'nin üzerinde TEM kökenli GSBL'in ortaya çıkmasına neden olmuştur. TEM-1'in transpozonda kodlanması sonucu bu enzim *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae* izolatlarına

geçmiştir ve bu mikroorganizmalarda gözlenen ampisilin ve penisilin direncinden sorumludur. GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türeği TEM-3'tür⁴⁶. GSBL fenotipi oluşturma yönünden bazı aminoasit değişiklikleri daha önemlidir; 104. pozisyonda glutamat yerine lizin, 164. pozisyonda arjinin yerine serin veya histidin, 238. pozisyonda glisin yerine serin ve 240. pozisyonda glutamat yerine lizin girmesi gibi. Aminoasitlerdeki değişiklikler sonucu GSBL'ların fenotiplerinde önemli değişiklikler olmakta oksimino-sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri ve izoelektrik noktaları değişebilmektedir³⁸. TEM grubu beta laktamazlar, *E. coli* ve *Klebsilla pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 *Pseudomonas aeruginosa*'da, TEM-17 *Capnocytophaga ochracea*'da bildirilmiştir.

Şekil 1: TEM-1'den köken alan bazı GSBL'lardaki aminoasit değişiklikleri⁴⁶



SHV Grubu

SHV-1 en sık *Klebsiella pneumoniae*'da bulunmaktadır ve bu bakterideki plazmid aracılığıyla gelişen ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türevi 1983 yılında bulunmuştur ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. TEM grubu GSBL'a kıyasla SHV-1'den köken alan enzimlerin sayısı daha düşüktür ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinde; 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir. Bunun dışında 179, 205 ve 240. pozisyonlardaki değişimler GSBL fenotipi için önemlidir. SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da bildirilmiştir^{38,46}.

CTX-M Grubu

Bu enzimler özellikle substrat olarak sefotaksimi tercih eden özelliğe sahiptir. Bu enzimler büyük olasılıkla *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal AmpC beta laktamazından köken almıştır; sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri TEM ve SHV türü GSBL'lar gibi dar spektrumlu enzimlerdeki aminoasit değişiklikleri sonucu değil, enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki yapısal değişiklik sonucudur. Bu enzimlerin diğer bir özelliği tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. Başlıca *Salmonella typhimurium* ve *E. coli*'de tanımlanmış olmakla birlikte diğer bazı enterik Gram negatif bakterilerde de gösterilmiştir.^{38,46,49,54}

OXA GRUBU

Bu enzimler diğer GSBL'ların aksine Ambler sınıflamasında D molekül grubunda yer alır. Oksasiline yüksek afinite göstermeleri nedeniyle bu adı almışlardır. Beta laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf bir biçimde inhibe edilirler. Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yatan bir hastadan izole edilen *Pseudomonas* suşunda bulunmuştur. Bu enzim genlerinin çoğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir^{38,46,49}.

İnhibitörlere Dirençli Beta Laktamazlar:

Beta laktamaz inhibitörleri klinikte kullanılmaya başlandığında bu antibiyotiklere karşı hemen hiç direnç gözlenmezken, 1997 yılından itibaren amoksisilin-klavulanik asite dirençli *E. coli*'ler bildirilmeye başlanmıştır. İnhibitörlere dirençli olan beta laktamazların üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz edememelerine karşın TEM veya SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'lar ile birlikte ele alınmışlardır. Bu enzimler önceleri 'Inhibitor-Resistant TEM' olarak adlandırılmış, ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV'de sıralamaya girmişlerdir; IRT-1 TEM-31, IRT-2 TEM-44, IRT-3 TEM-32, IRT-14 TEM-45 gibi. IRT'ler en sık olarak *E. coli*'de bulunmakla birlikte *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmiştir^{38,46}.

PER Grubu

Bu enzimlerden PER-1 ülkemizde önce *S. typhimurium*, takiben *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *P. aeruginosa* izolatlarının %10'u, *A. baumannii* izolatlarının % 40'ı bu enzimi taşıyarak seftazidime direnç göstermektedir. Bu bakterilerle nozokomiyal infeksiyon geliştiren hastalarda, bakterinin PER-1 enzimini taşıyor olması mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde belirleyici olarak saptanmıştır. PER-1 ülkemiz dışında Fransa (Türkiye'den giden bir hastadan elde edilen bir izolatta) ve İtalya'da *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmış ve yakın zamanda Güney Kore'den bildirilen bir raporda *Acinetobacter* izolatlarının %56'sında bulunduğu gösterilmiştir⁴⁶. PER grubu enzimler özellikle seftazidim olmak üzere aminotiazolil sefalosporinlere direnç sağlarlar⁴³. Penisilinler bu enzimler için zayıf birer substrat olup, piperasilin in-vitro olarak PER enzimlerine karşı aktivitesini korur. Beta laktamaz inhibitörleri, sefamisinler ve karbapenemler de bu enzimlere karşı aktivite gösterirler⁵⁵.

Diğer GSBL'lar

VEB-1 enzimi ilk kez Vietnam'da bir *E.coli* suşundan daha sonra Tayland'ta bir *P.aeruginosa* suşundan elde edilmistir^{38,46}. CME-1 enzimi bir *Chryseobacterium meningosepticum* suşundan, TLA-1 bir *E.coli* suşundan elde edilmiştir. PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1 enzimleri %50 homoloji göstermektedir ve oksimino-sefalosporinlere özellikle seftazidime ve aztreonama etkilidirler^{38,55}.

2.7. GSBL Tanı Yöntemleri

Farklı GSBL tiplerinin saptanması ve yeni enzimlerin tanımlanması için fenotipik ve genotipik yöntemler uygulanmaktadır. İzolatların direnç/duyarlılık fenotipleri enzim tipleri açısından yol gösterici olmaktadır⁵⁶.

GSBL üreten etkenlerle enfekte hastalara geniş spektrumlu beta laktam ajanların uygulanması genel olarak tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Tedavinin başarılı olması için; klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu enzimleri saptamada standart tarama ve doğrulama testlerini uygulamaları ve sonuçları doğru yorumlamaları gerekmektedir^{49,57}. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), GSBL üreten suşların rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde sefalosporinlere duyarlı görünseler bile bütün sefalosporin, penisilin ve aztreonama dirençli olarak bildirilmesini önermektedir. Yanlış GSBL pozitif bildirimler, günümüzde en etkili ve en önemli tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı direnç gelişimine, maliyet artışına, aynı zamanda yanlış negatif bildirimler ise tedavi başarısızlığına yol açacaktır⁵⁷. Beta laktamaz üretimini saptamak için rutinde kullanılan yöntemler direkt ve indirekt olarak iki tiptir. Hastane enfeksiyonu etkeni Gram negatif bakterilerde önem taşıyan indirekt testlerdir³⁶.

Beta laktamaz belirleme yöntemleri^{36,46}.

I- Direkt olarak beta laktamaz saptayan yöntemler

1. İyodometrik yöntem
2. Asidometrik yöntem
3. Kromojenik yöntem

II- İndirekt testler (beta laktamaz grubunu belirleyen) testler

1. İndüklenebilir beta laktamaz belirleyen testler
2. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz testleri

a. Ön tarama olarak seftazidim veya üçüncü kuşak herhangi bir sefalosporin veya aztreonam direnci; indüklenebilir beta laktamaz'ı olan suşlar dışında sefoksitin duyarlılığı.

b. Klavulanik asitle inhibisyon özelliğine dayanan testler.

- Çift disk sinerji testi
- Klavulanik asit kombinasyonlu MİK testleri
- E-test
- Otomatize sistemler

c. Üç boyutlu test

III- Beta laktamaz tipini belirleyen testler

1- İzoelektrik focusing

2- Moleküler yöntemler

- DNA problrı
- PCR
- Oligotiplendirme
- PCR-RFLP
- PCR-SSCP
- LCR
- Nükleotid sekans analizleri

Rutin laboratuvarlar için tanımlanmış GSBL saptama yöntemleri, tarama ve doğrulama testleri olarak iki kısımda incelenebilir⁵⁶.

2.7.1. GSBL Tarama Testleri

CLSI, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* izolatlarında GSBL üretiminin taranması ve doğrulanması için standartlar geliştirmiştir. CLSI önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azalmasını saptayan doğrulama testleri uygulanmalıdır. CLSI M100-S16'a göre GSBL'lar için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değeri sınırları tabloda gösterilmiştir⁵⁶.

Tablo 3: GSBL tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değeri sınırları

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µ/ml)
Sefotaksim (CTX) 30 µg	≤ 27	≥ 2
Seftriakson (CRO) 30 µg	≤ 25	≥ 2
Seftazidim (CAZ) 30 µg	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksime (POD) 10 µg	≤ 17	≥ 2
Aztreonam (ATM) 30 µg	≤ 27	≥ 2

2.7.2. GSBL Doğrulama Testleri

Fenotipik doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler, GSBL'ları beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen Amp-C tipi enzimlerin ayırımında kullanılmaktadır.

Doğrulama amacıyla değişik yöntemler tanımlanmıştır. Bunlar; klavulanik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı, çift disk sinerji yöntemi (ÇDS), üç boyutlu yöntem, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi, minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK)'unun saptandığı dilüsyon yöntemleri, E-test stripleri ile MİK'in saptanması gibi yöntemlerdir^{46,56}.

Klavulanik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı:

CLSI önerilerine göre; klavulanik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse, ya da bir diğer değerlendirme yöntemi; klavulanik içeren ve içermeyen diskler etrafındaki inhibisyon zonlarının birbirine oranı ≥ 1.5 olması halinde izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir^{51,56}.

Çift disk sinerji yöntemi (ÇDS): Bu yöntemde test edilecek izolat agar disk difüzyon kurallarına göre agar yüzeyine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin klavulanik asit (AMC 20/10 μ) diski ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde, 30 μ g'lık seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam veya sefpodoksim diskleri yerleştirilir. İnkübasyondan sonra sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon

zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakteri üremeyen bir sinerji alanının bulunması, GSBL varlığını gösterir^{46,51,56}.

Broth Mikrodilüsyon: GSBL üretiminin belirlenmesi amacıyla, beta laktamaz inhibitörleri varlığında sefalosporin direnç düzeylerindeki azalmanın gösterilmesi için ayrıca standart mikrodilüsyon yöntemi de kullanılabilir. Bu durumda sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başlarına, hem de klavulanik asit (4 µg/ml) varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde $\geq 3\log_2$ azalma, GSBL göstergesi olarak kabul edilir^{55,56}.

GSBL E-test stripleri: Stripler bir ucunda seftazidim, diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır. Seftazidim/sefotaksim ve seftazidim/sefotaksim klavulanik asit MİK değerleri birbiriyle oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat azalma olması GSBL varlığını gösterir⁵⁶.

2.7.3. Moleküler Yöntemler

Antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle birlikte, direnç artmaya başlamış ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisi daha problemli hale gelmiştir. Direncin hızlı ve doğru olarak saptanması, direnç gelişimi ve yayılmasının önlenmesinde kritik öneme sahiptir⁵⁸.

Fenotipik testler GSBL'in varlığını ortaya koyarken, moleküler yöntemler GSBL tiplerini belirlemede kullanılan önemli yöntemlerdir. GSBL tanımlanmasında esas olarak PZR tabanlı yöntemler kullanılmaktadır.

İzoelektrik Nokta Tayini (Isoelectric Focusing): Tanımlama için sık olarak uygulanan bu yöntem, sonikasyon yöntemiyle parçalanması sonucunda elde edilen ekstrelerin poliakrilamid jellerde yürütülmesi temeline dayanır. Elektroforez sonucu beta laktamazlar, izoelektrik noktaları (pI)'ında odaklanır. İzoelektrik noktalar sadece enzim ailesi hakkında bilgi verir. Örneğin, pI 5.2-5.7 TEM, pI 7.4-8.2 SHV, pI 7.0-7.2 OXA, pI 8.3-9 AmpC tipi enzimler olarak kabul edilmiştir⁵⁶.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): SHV, TEM gibi beta laktamazlara spesifik oligonükleotid 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 enzim varyantları arasında ayrımı sağlamaz⁴⁶.

Oligotiplendirme: Bu yöntemde, hibridizasyon koşulları altında oluşan nokta mutasyonlarının saptanması için tasarlanan oligonükleotid problemleri kullanılır. Bu yöntemin kullanılmasıyla klinik izolatlar arasındaki çeşitli yeni TEM varyantları saptanabilmektedir. Oligotiplendirmede kullanılan beta laktamazlar bir radyoizotop veya biyotinle işaretlenir⁴⁶.

PCR-RFLP (PCR Restriction fragment length polymorphism): Polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, amplifiye edilmiş PCR ürünleri restriksiyon endonükleazlarla kesilir ve elektroforezle kesim ürünlerinin ayrımı yapılır. Her restriksiyon enziminin meydana getirdiği bölgenin büyüklüğü yapısal gendeki nokta mutasyonlarını gösterir. Bu yöntem sadece GSBL fenotipini ortaya koyar⁵¹.

PCR-SSCP (PCR-Single-Strand conformational polymorphism analysis): Polimeraz zincir reaksiyonu tek zincirde konformasyon polimorfizmi, özgül yerleşimdeki tek baz mutasyonlarını saptar. Bu yöntemle alt tipler saptanabilir⁵¹.

LCR (Ligase chain reaction): Sistem, DNA çoğaltılması amacıyla geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Hedef DNA, denatüre edilir ve biotinle işaretli oligonükleotid primerler ile bağlanarak farklı pozisyonadaki mutasyonlar saptanır⁵¹.

Nükleotid Dizi Analizi (DNA sequencing): Klonlama ve dizi analizi GSBL tanımlamasındaki altın standarttır. Bu yöntemle farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilir. Elde edilen dizi Gen Bankası verileri ile kıyaslanarak bilinen bir enzim mi, yoksa yeni bir GSBL mi olduğu saptanır.

Tablo 4: GSBL saptanmasında kullanılan yöntemler⁴⁶.

Yöntem tipi	Test adı	Avantaj	Dezavantaj
Fenotipik(rutin)	Standart CLSI yorum kriterleri	Kolaylıkla ve her laboratuarda uygulanabilir	GSBL her zaman 'direnç' kategorisinde değildir
	CLSI doğrulama testleri	Uygulama ve yorum kolaydır	Duyarlılık oksiminosefalosporin seçimine göre değişir
	Çift disk sinerji	Uygulama ve yorum kolaydır	Disklerin yerleştirildiği uzaklık standart değildir
	Üç boyutlu test	Duyarlı, yorumu kolay	GSBL'lere özgül değil, emek yoğun
	E-test GSBL stripleri	Uygulaması kolay	Yorum her zaman kolay değildir. ÇDS kadar duyarlı değil, maliyet yüksek
	Vitek GSBL	Uygulaması kolay	Duyarlılık düşük veri tabanına bağlı
Genotipik (moleküler)	DNA Probları	Gen ailesine özel (ör. TEM yada SHV gb)	Emek yoğun, GSBL-dar spektrumlu ayrımı yapılamaz. TEM ve SHV türevleri ayrılmaz
	PCR	Uygulaması kolay, gen ailesine özel	GSBL-dar spektrumlu ayrımı yapılamaz. TEM ve SHV türevleri ayrılmaz.
	Oligotiplendirme	Özgül TEM varyantları saptanır.	Özel oligonükleotid problemleri gerekir, emek yoğunur, yeni varyantlar saptanamaz.
	PCR-RFLP	Uygulama kolaylığı, spesifik nükleotid değişimleri saptanır.	Nükleotid değişimlerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gereklidir.
	PCR-SSCP	Bazı SHV varyantların ayırımında kullanılır.	Özel elektroforez koşulları gereklidir.
	LCR	Bazı SHV varyantların ayırımında kullanılır.	
	Nükleotid dizi analizi	Altın standart, yeni enzimler saptanır.	Teknik olarak özel cihazlar gerekir, yoğun çalışma gerektirir.

2.8. GSBL'ların Epidemiyolojik Özellikleri

GSBL enzimleri tüm dünyada hastane enfeksiyonlarında önemli bir problem haline gelmiştir ve ayaktan tedavi edilen hastalarda da görülme sıklığı artmaya başlamıştır, GSBL diğer beta laktamazlarla da birlikte bulunabilir. GSBL üreten bakteri ilk olarak 1983 yılında Almanya'dan, ilk hastane kaynaklı salgın da 1985 yılında Fransa'dan bildirilmiştir. Daha sonra Amerika Birleşik Devletleri'nden ve tüm dünyadan GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlar ve salgınlar rapor edilmiştir⁴⁶. GSBL genleri taşıyan plazmidler aynı zamanda aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfonamid direnç genlerini de taşıyabilir. Bir çok merkezde bu plazmidlerin yayılması veya klonun yayılması ile oluşan GSBL salgınları bildirilmiştir. Bazen bu yayılma o kadar yoğun olabilir ki hastanede yatan hastaların üçte biri GSBL üreten suşlarla enfekte veya kolonize olurlar. Bu tür salgınlar Amerika ve Avrupa'daki farklı hastanelerden bildirilmiştir. GSBL üreten mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonlarda bağımsız risk faktörlerini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. En sık belirlenmiş olan risk faktörleri uzun süreli hastanede kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma veya daha önceden de hastanede kalma, yabancı materyal ve invaziv girişimler, ileri yaş, malignite, diyabet, kalp hastalığı gibi kronik hastalıklar ve uzun süreli antibiyotik ve özellikle üçüncü kuşak sefalosporin kullanımıdır⁵⁹.

Klinik Önemi; GSBL pozitif mikroorganizmalar başlıca sepsis, üriner sistem enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonlarına, peritonit, kolanjit, katater enfeksiyonu, menenjit ve sinüzite neden olur.

Tablo 5: GSBL kaynaklı enfeksiyonlarda tanımlanmış risk faktörleri⁵⁹.

Tanımlanmış risk faktörleri	
Hastanın yattığı ünite	Yabancı materyal invaziv girişimler
Yoğun bakım Cerrahi ünite Pediatrik ve yenidoğan üniteleri Rehabilitasyon üniteleri Bakım evleri Onkoloji üniteleri	Santral venöz Sonda Entübasyon ve mekanik ventilasyon Trakeostomi Gastrostomi Nazogastrik tüp
Aldığı tedavi ve süre	Hastanın demografik özelliği ve altta yatan hastalık
Uzun süreli antibiyotik Üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı Aminoglikozid kullanımı Uzun süreli hastanede kalış Uzun süreli yoğun bakımda kalış	İleri yaş Yaş <12 hafta olması Düşük doğum ağırlığı Altta yatan ciddi hastalık Malign hastalık Kalp yetmezliği Diabetis mellitus Acil abdominal cerrahi girişim Bağırsak kolonizasyonu Safra yolu hastalığı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1. Laboratuvar Malzemeleri

1. Petri plağı, tek kullanımlık (Alkim)
2. Platin öze (iğne uçlu-yuvarlak uçlu)
3. Pamuklu eküvyon
4. Ependorf tüpler
5. Cam test tüpü (değişik ebatlarda)
6. Tüplük
7. Balon joje, 100ml, 500ml, 1000ml
8. Steril 96 kuyucuklu mikropleyt
9. Tek kanallı otomatik mikropipet 1-10 µl, 5-100 µl
10. Steril pipet uçları
11. Çok kanallı otomatik pipet 50-200 µl (Biohit)
12. Bunsen beki
13. Otoklav (Nüve OT 4060)
14. Pastör fırını (Heraeus NR 900)
15. Etüv (Nüve)
16. Sıcak su banyosu (Schwabach)

17. Hassas terazi (Shimatzu)
18. Vorteks (Firlabo)
19. Derin dondurucu (-20 °C, -40 °C) (Snijders)
20. Laminar flow (Teknomar)
21. Termal döngü cihazı (Premius 96 plus, MWG Biotech)
22. Elektroforez tankı (CSL-İngiltere)
23. Jel görüntüleme cihazı (Canon PC1089)

3.1.2. Besiyerleri

1. Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Merck)
2. Muller Hinton Agar (MHA) (Merck)
3. Muller Hinton Broth (MHB) (Merck)
4. Kanlı agar
5. Brain Heart Infusion Broth (Fluka)

3.1.3. Referans Antibiyotikler

1. Sefotaksim (Biofarma)
2. Sefuroksim (Bioanaliz)
3. Amoksisilin (Deva İlaç)
4. Klavulanik asit (Bioanaliz)

3.1.4. Kimyasal Malzemeler

1. Gliserol 50 ml
2. Tris (Carlo Erba reagent)
3. Borik asit (Merck)
4. Hidroklorik asit (Merck)
5. Etilen Diamin-Tetraasetik-Asit (EDTA) (Sigma))
6. Agaroz (Serva)
7. Etidyum bromür (Amresco)
8. K181-1000 bç'lik moleküler ağırlık belirteci (Amesco)

PZR Tamponları

Reaksiyon Tamponu (10X) (Bioron)

1000 mM Tris-HCL pH 8.3

500 mM KCL

25 mM MgCl₂

% 0.01 (w/v) jelatin

% 50 Gliserol

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 Nükleotitler ; dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Oligonükleotid Primerleri

bla TEM F 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3' ⁶¹

R 5'-CGT ACA GTT ACC AAT GCT TA-3'

Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

TBE tamponu (10X) : 90 mM Tris-base

90 mM Borik asit

2 mM Na-EDTA

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

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

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

<u>Agaroz</u>	:	%2'lik
		2 gr agaroz
		100 ml 0.5X TBE
<u>Yükleme tamponu</u>	:	% 0.25 Brom fenol mavisi
		%40 (w/v) Sukroz
<u>Etidyum bromür</u>	:	10 mg Etidyum bromür
		1 ml distile su

3.1.6. Örneklerin Seçilmesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından 1112 *E. coli* suşu temin edildi. Bu suşlar 1 Ocak 2008 ve 1 Mayıs 2008 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Hastanesi Poliklinik ve Kliniklerine başvuran hastalara ait örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Bu suşların disk difüzyon ve çift disk sinerji yöntemlerine göre 1112 *E. coli* suşundan GSBL (+) olan 156 *E. coli* suşu ile çalışılmıştır. Bu suşların kaynağı araştırılmıştır.

Çalışmada kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 suşları kullanılmıştır. Standart suşlar Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

156 *E. coli* izolatının kaynağı araştırılmış bu suşların aşağıdaki tabloda verildiği gibi çeşitli klinik örneklerden sağlandığı saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. *E. coli* suşlarının izolasyon kaynaklarına göre dağılımı

MATERYAL	TOPLAM	
	ADET	%
Abse	3	2
Balgam	2	1
Bronş Lavajı	1	1
Endotrakeal Aspirasyon	1	1
İdrar	126	81
Kan	3	2
Katater	3	2
Periton Sıvısı	1	1
Pü	2	1
Safra Sıvısı	2	1
Yara	12	8
TOPLAM	156	100

Çalışmaya alınan 156 adet *E. coli* suşu 126 adet (%81) idrar, 12 adet (%8) yara, 3 adet (%2) kan, 3 adet (%2) katater, 3 adet (%2) abse, 2 adet (%1) balgam, 2 adet (%1) safra sıvısı, 2 adet (%1) pü, 1 adet (%0.64) bronş lavajı, 1 adet (%0.64) endotrakeal aspirasyon ve 1 adet (%0.64) periton sıvısı kültüründen izole edildiği belirlenmiştir.

Tablo 7. *E. coli* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

BÖLÜM	ADET	%
Acil	14	9
Enfeksiyon	10	6
Genel Cerrahi	15	10
Göğüs Hastalıkları	4	3
İç Hastalıkları	11	7
Kadın Doğum	7	4
Kardiyoloji	5	3
Nefroloji	23	15
Ped. Cerrahi	6	4
Pediatric	19	12
Üroloji	29	18
Yoğun Bakım	4	3
DİĞER	9	6
TOPLAM	156	100

GSBL (+) *E. coli* izolatları; Acil 14 (%9), Enfeksiyon Hastalıkları 10 (%6), Genel Cerrahi 15 (%10), Göğüs Hastalıkları 4 (%3), İç Hastalıkları 11 (%7), Kadın Doğum 7 (%4), Kardiyoloji 5 (%3), Nefroloji 23 (%15), Pediatric Cerrahi 6 (%4), Pediatric 19 (%22), Üroloji 29 (%18), Yoğun Bakım 4 (%3) ve diğer kliniklerden 9 (%6) adet olmak üzere çeşitli kliniklerden sağlanmıştır (Tablo 7)

Çalışmada kullanılmış *E. coli* izolatları kaynaklarının yaşları ve cinsiyetleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 8, Tablo 9).

Tablo 8. *E. coli* izolasyonlarının yaş gruplarına göre dağılımı

		TOPLAM	
		ADET	%
0-5	1. grup	22	14
6-16	2. grup	27	17
17-45	3. grup	30	19
46-59	4. grup	33	21
60 yaş üzeri	5. grup	44	28
	TOPLAM	156	100

İzolatların temin edildiği kaynaklar yaşlarına göre 5 gruba ayrılmıştır; 1. grup (0-5 yaş) 22 (%14), 2. grup (6-16 yaş) 27 (%17), 3. grup (17-45 yaş)30 (%19), 4. grup (46-59 yaş) 33 (%21), 5. grup (60 yaş üzeri) 44 (%28) adettir (Tablo 8).

Tablo 9. *E. coli* suşlarının cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Kişi	%
Erkek	57	37
Kadın	99	63
TOPLAM	156	100

İzolatların cinsiyetlere göre dağılımı; 57'si erkek (%37), 99'u (%63) kadındır. İzolatların 80 (%51)'inin poliklinik, 76 (%49)'sının klinikten başvurduğu bildirilmiştir.

3.2. Yöntem

Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 156 *E. coli* suşu ile yapılmıştır. İzolatlar biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmıştır. Disk difüzyon ve çift disk sinerji yöntemlerine göre GSBL üretimi belirlenmiş izolatların GSBL üretimi MİK testi ile doğrulanmıştır. TEM direnç geni varlığının gösterilmesinde PZR moleküler tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla sağlanan izolatların DNA'ları elde edilmiş ve amplifikasyonları yapılmıştır. Agaroz jel elektroforeziyle 156 *E. coli* izolatında TEM geni varlığı araştırılmıştır.

3.2.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Çift disk sinerji yöntemi ile tanımlanmış GSBL (+) 156 *E. coli* suşu EMB (Eozin Metilen Blue) besiyerinden iğne öze ile tek koloni alınarak, etüvde 37°C de 24 saatlik inkübasyon sonucu kültür saflaştırılmıştır. Her izolat numaralandırılarak, izolatın sağlandığı kişinin adı soyadı, yaşı, cinsiyeti, gelen numunenin cinsi, yatan hasta mı, poliklinik hastası mı olduğu, geldiği klinik ve tarih kaydedilmiştir.

Rutin testlerle tanımlanmış olan *E. coli* saf kültürleri, Brain Heart Infusion Broth besiyerinde, steril %5 gliserol ilavesi ile ependorf tüplerde, ağızları parafilm ile sarılarak -40°C' de çalışma için saklanmıştır. Derin dondurucuda saklanan stokların canlandırılması için kanlı agar besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2. Fenotipik Doğrulama Testi

Fenotipik doğrulama testi sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) CLSI kriterleri doğrultusunda yapılmıştır. Antibiyotik konsantrasyonları CLSI'nın önerdiği çözücü ve

sulandırıcılar kullanılarak $\text{Ağırlık(mg)} = \text{Hacim(ml)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) / \text{Potens } (\mu\text{g/mg})$ formülü ile hazırlanmıştır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlanan katyon ayarı yapılmış Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri ile çift katlı dilüsyon ile amoksisilin, amoksisilin+klavulanik asit, sefotaksim, sefotaksim+klavulanik asit, sefuroksim, sefuroksim+klavulanik asit ile MİK değerleri saptanmıştır. Sefotaksimin klavulanik asit varlığında MİK değerlerinin, tek başına test edildiğindeki göre $\geq 3\log_2$ azalması durumunda GSBL varlığı doğrulanmıştır.

Çalışma, U tabanlı steril mikrodilüsyon plaklarında yapılmıştır. Her kuyucuğa otomatik pipet ile 100 μl MHB pipetlenmiştir. İlk kuyucuklara 100 μl antibiyotik stok solüsyonu eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra alınan 100 μl bir sonraki kuyucuğa aktararak, antibiyotiğin çift kat seri dilusyonları elde edilmiştir.

Test edilecek bakterilerin kültürü bir gün önce MHA besiyerine ekimi yapılarak tazelenmiştir. Üremiş olan kolonilerden 3-4 koloni öze ile alınarak MHB besiyerinde 0.5 McFarland standardına ulaşınca kadar inkübe edilip, 10^4 CFU/ml bakteri olacak şekilde MHB besiyerinde hazırlanıp, negatif kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa 10 μl inoküle edilmiştir. Her mikrolakta besiyeri ve mikroorganizma kontrolleri yapılmıştır. . Kontrol için *E. coli* ATCC 25922, ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 standart suşları kullanılmıştır.

Mikroplakların üstleri kapatılarak bir gece 35°C'de inkübe edilmistir. İnkubasyon süresi sonunda kuyucuklardaki bulanıklık çıplak gözle değerlendirilmiştir. Bulanıklığın (üremenin) gözlenmediği son kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu o suş için MİK değeri olarak kaydedilmiştir.

3.2.3. Moleküler Yöntem

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* izolatlarının kanlı besiyerine ekilerek bir gece 37°C etüvde inkübe edilerek kültürleri yapılmıştır. *E. coli* izolatlarının DNA izolasyonu kaynatma yöntemi kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu bakteri kültüründen 3-4 koloni alınarak 100 µl 0.1 mM Tris (pH 7.0) tamponunda, 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır⁶⁰. İzole edilen DNA'ların varlığı % 1'lik agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TEM tipi genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının gösterilmesinde PZR yöntemi kullanılmıştır. İzolatların amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri TEM genine özgül olarak seçilmiştir TEM geni amplifiye ürünü 1075 bp büyüklüğündedir⁶¹.

Amplifikasyonda *Escherichia coli* DNA'sından 5 µl kalıp olarak kullanılmıştır. PZR reaksiyon karışımı; 33.3 µl steril distile su, 5 µl 10X PZR tamponu, 5 µl 25 mM MgCl₂, 0.2 µl 25 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primer karışımından 1 µl primer (10 pmol) ve 0.5 µl 5U Taq polimeraz enzimi kullanılarak 50 µl hacimde hazırlanmıştır.

Amplifikasyon DNA ısı döngü (Thermal Cycler) cihazında; 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından,

95°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika primer bağlanması (annealing), 68°C'de 1 dakika sentez (uzama) döngüsünden toplam 40 döngü ve son sentez aşaması 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlenmiş program kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye ürünlerin varlığının belirlenmesinde %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. %2'lik agaroz jel 0.5XTBE tamponu ve 0.5 µl etidyum bromür ile hazırlanmıştır. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilerek jelin her bir kuyucuğuna 10 µl amplifiye ürün 5 µl yükleme tamponu ile yüklenmiştir. Amplifiye ürünlerin büyüklüklerinin belirlenmesinde 2 µl K181-1000 bp'lik moleküler ağırlık belirteci (Amesco) kullanılmıştır. Amplifiye ürünlerin elektroforezi 0.5XTBE tamponunda 90 volt elektrik akımında yürütülerek yapılmıştır.

U.V transilluminatörde DNA ağırlık belirtecine göre 1075 bp büyüklükte bant belirlenen amplifiye ürünlerin TEM geni olan *E. coli* izolatları olduğu belirlenmiştir, 1075'lik bant gözlenmeyen izolatların TEM geni içermediklerine karar verilmiştir

Jellerin görüntülenmesi Canon PC1089 cihazı kullanılarak yapılmıştır.

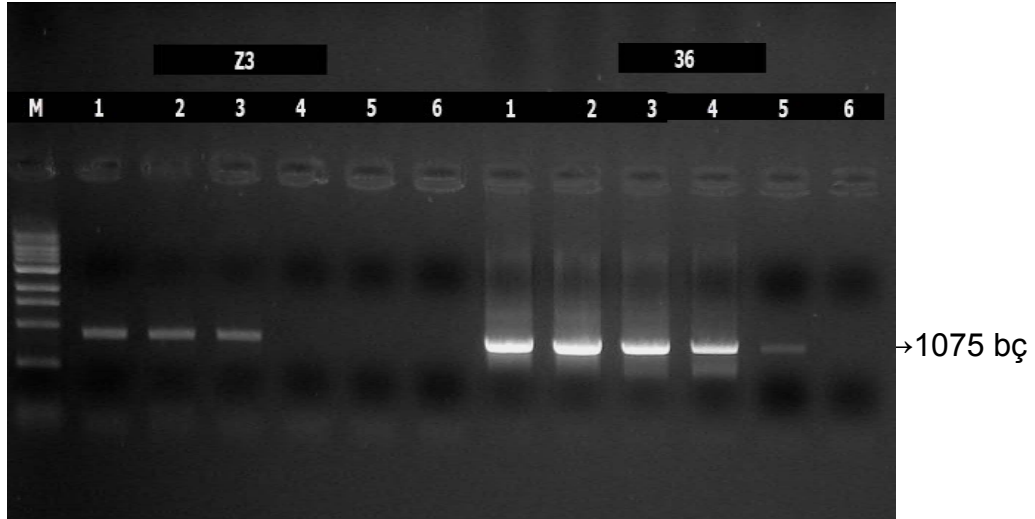
4. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından sağlanan 1112 *E. coli* izolatından çift disk sinerji yöntemine göre GSBL (+) 156 *E. coli* izolatı çalışmaya alınmış. MİK testi ile GSBL pozitifliği doğrulanmıştır. 156 *E. coli* izolatının kaynağı araştırılmıştır.

TEM tipi GSBL (+) örneklerin PZR ile tespiti

Çift disk sinerji testine göre GSBL (+) olduğu tespit edilen 156 örnekte TEM tipi beta laktamaz varlığı PZR tekniğiyle araştırılmıştır.

156 *E. coli* izolatının 83 (%53.2) örnekte TEM geni varlığı (1075 bp) belirlenirken 73 (%46.8)'ünde TEM geni varlığı (negatif) bulunamamıştır (Şekil 2).

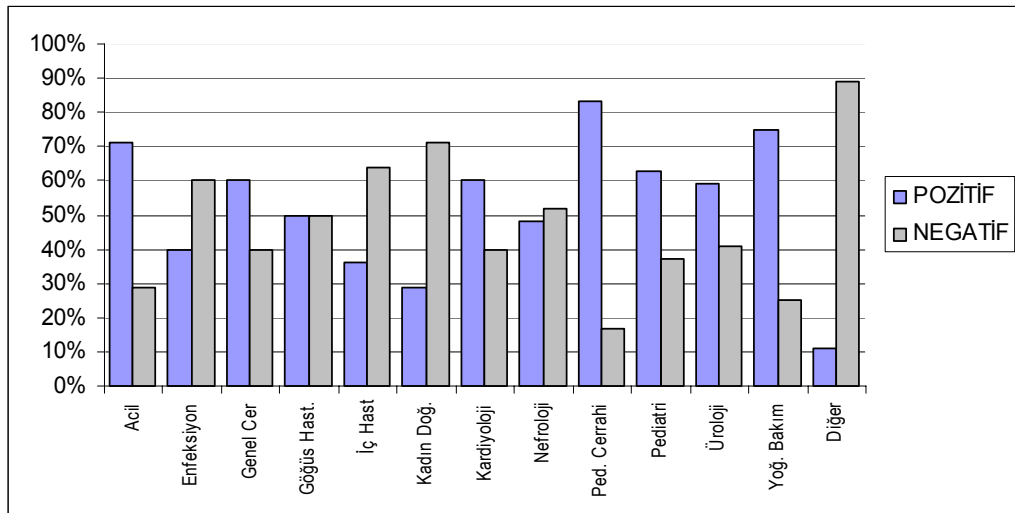


Şekil 2. 1075 bp uzunluğundaki blaTEM'in agaroz jeldeki görüntüsü

Fenotipik doğrulama testinde negatif bulunan 15 izolatın 8'inde PZR'la TEM beta laktamaz enziminin varlığı gösterilmiştir.

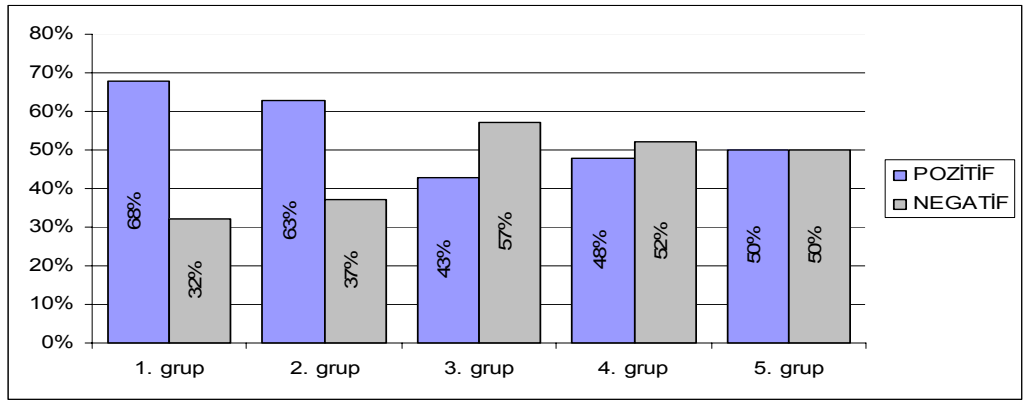
MİK testi sonuçlarına göre 141 izolat (%90) pozitif, 15 izolat (%10) negatif bulunmuştur. Tüm isolatlar amoksisiline karşı dirençli bulunmuştur.

E. coli isolatlarının kliniklerdeki dağılımlarına göre, TEM beta laktamaz içeren isolatların sayısı ve yüzdesi belirlenmiştir (Grafik 1). Acil'den gelen 14 izolatın 10 (%71)'u TEM tipi beta laktamazla GSBL oluştururken, Enfeksiyon kliniğinden 10 izolatın 4 (%40)'ü, Genel Cerrahi kliniğinden 15 izolatın 9 (%60)'u, Göğüs Hastalıkları kliniğinden 4 izolatın 2 (%50)'i, İç Hastalıkları kliniğinden 11 izolatın 4 (%36)'ü, Kadın Doğum kliniğinden 7 izolatın 2 (%29)'si, Kardiyoloji kliniğinden 5 izolatın 3 (%60)'ü, Nefroloji kliniğinden 23 izolatın 11 (%48)'i, Pediatrik Cerrahi kliniğinden 6 izolatın 5 (%83)'i, Pediatri kliniğinden 19 izolatın 12 (%63)'si, Üroloji kliniğinden 29 izolatın 17 (%59)'si, Yoğun Bakım ünitesinden 4 izolatın 3 (%75)'ü ve diğer kliniklerden gelen 9 izolatın 1 (%11)'inde TEM tipi beta laktamaz varlığı (+) gösterilmiştir (Grafik 1).



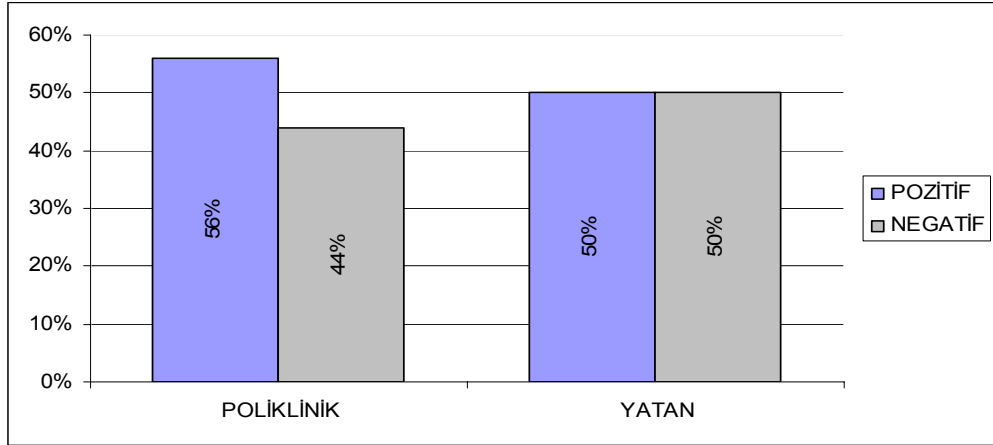
Grafik 1. TEM tipi beta laktamaz enzimi saptanan isolatların izole edildiği kliniklere göre dağılımları

E. coli izolat kaynaklarının yaş grupları dağılımına göre, 1. grupta (0-5 yaş) 22 izolatın 15 (%68)'inde, 2. grupta (6-16 yaş) 27 izolatın 17 (%63)'sinde, 3. grupta (17-45 yaş) 30 izolatın 13 (%43)'ünde, 4. grupta (49-59 yaş) 33 izolatın 16 (%48)'sinde, 5. grupta (60 yaş üstü) 44 izolatın 22 (%50)'sinde TEM beta laktamaz varlığı tespit edilmiştir (Grafik 2).



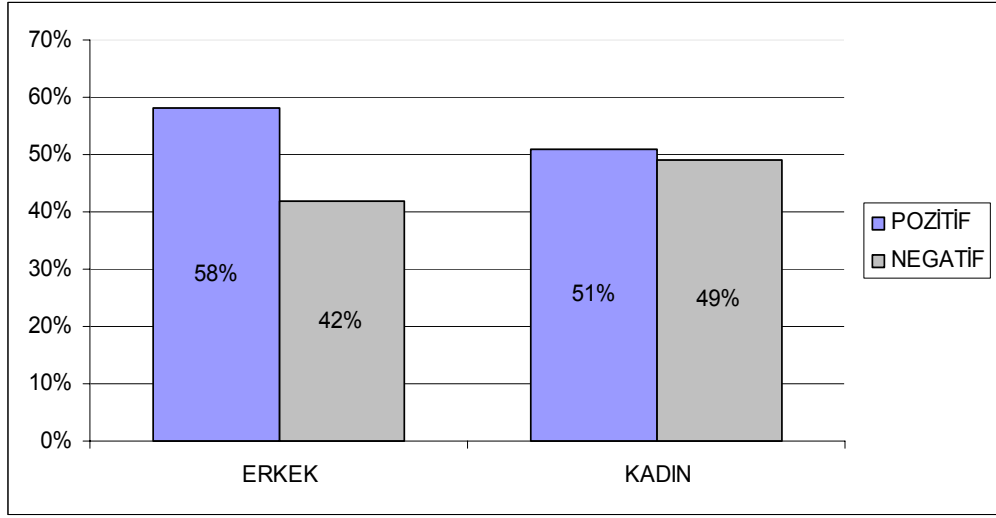
Grafik 2. Yaş gruplarına göre TEM tipi beta laktamaz enzimi saptanan *E. coli* izolatlarının yüzdeleri

Poliklinik kaynaklı 80 izolattan 45 (%56)'inde ve çeşitli kliniklerden toplanan gruptaki 76 izolattan 38 (%50)'inde TEM tipi beta laktamaz enzim varlığı tespit edilmiştir (Grafik 3).



Grafik 3. Poliklinik ve klinik kaynaklı *E. coli* izolatlarındaki TEM tipi beta laktamaz varlığının oransal dağılımı

E. coli izolatı kaynaklarının cinsiyetine göre hazırlanan grafikte; 57 erkek hasta izolatının 33 (%58)'ünde, 99 kadın hasta izolatının 50 (%51)'sinde TEM tipi beta laktamaz enzim varlığı gösterilmiştir (Grafik 4).



Grafik 4. *E. coli* izolatlarında cinsiyete göre TEM tipi beta laktamaz enziminin oransal dağılımı

Tablo 10. TEM tipi beta laktamaz varlığı tespit edilen *E. coli* izolatlarının kaynağına göre dağılımı.

MATERYAL	ADET	Toplam
Abse	1	3
Balgam	2	2
Bronş Lavajı	1	1
Eta	1	1
İdrar	64	126
Kan	2	3
Katater	1	3
Periton Sıvısı	0	1
Pü	1	2
Safra Sıvısı	1	2
Yara	9	12
Toplam	83	156

TEM tipi beta laktamaz üreten suşların materyal kaynaklarına göre dağılımı; absede %33, balgamda %100, bronş lavajında %100, endotrekeal aspirasyonda %100, idrarda %51, kan izolatlarında %67, kataterde %33, periton sıvısında %0, Pü %50, safra sıvısında %50 ve yarada %75'dir.

5. TARTIŞMA

Escherichia coli, üriner sistem enfeksiyonları başta olmak üzere yol açtığı değişik hastalık tabloları ile insan sağlığı üzerindeki önemini korumaktadır. Beta laktam antibiyotikler antibiyotik grupları arasında en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Özellikle yan etkileri daha az olan bu antibiyotik grubundaki direncin takip edilmesi daha da fazla önem taşımaktadır. İkinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler etki spektrumlarının uygunluğu ve yan etkilerinin az olması nedeniyle, idrar yolu enfeksiyonlarında ve diğer *E. coli* enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotiklerdendir⁶².

Dünyada ve ülkemizde beta laktam antibiyotiklere karşı Gram negatif bakterilerde görülen direnç hızla artmaktadır⁶³. Bu grup antibiyotiklere direnç sıklıkla beta laktamaz enzimlerinin üretilmesiyle gerçekleşir. Üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı oluşan dirençten GSBL enzimleri sorumludur ve sıklıkla *E. coli* ve *Klebsiella* suşlarında rastlanmaktadır. Bu enzimler penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamların çoğunluğunu inaktive ederler. Kromozomal veya plazmid kökenlidir ve kolaylıkla yayılabilme özelliği taşırlar⁶⁴. GSBL'lerin TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta laktamaz genlerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir⁶⁵. Araştırmamızda Gazi Üniversitesi Hastanesinden temin edilen 156 GSBL (+) izolatta TEM tipi beta laktamaz üretim oranını saptadık (%53.2). Bu oran dünyada yapılan benzer çalışmalarla kıyaslandığında yüksek olduğu belirlenmiştir⁶⁶.

GSBL sıklığı antibiyotik kullanımına bağlı olarak ülkeler, hastaneler, hatta aynı hastane içindeki farklı birimler arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir. 2006 yılında EARSS (European Antibiotic Resistance Surveillance System)'nin yaptığı çalışmada ülkeler arasında bile direnç oranları bakımından önemli farklar olduğu açıklanmıştır. *E. coli*

izolatlarındaki GSBL üretim oranları Estonya'da %1, Romanya'da %41, İzlanda'da %0, Fransa'da %2, Türkiye'de %21'dir⁶⁷. Çalışmamızda 1112 *E. coli* izolatından 156'sının GSBL (+) olduğu tespit edilmiştir. GSBL (+) olan *E. coli* direnç oranının da %14 olduğu belirlenmiştir. Delialioğlu ve ark. yaptıkları çalışmada direnç oranını %18.3 olarak belirlemişlerdir⁶⁸. Diğer bir çalışmada ise direnç oranı %14 olarak tespit edilmiştir⁶⁹. Yapılan diğer araştırmalarda GSBL direnç oranlarının %5-39 aralığında değiştiği gösterilmiştir⁷⁰.

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında poliklinik ve klinik kaynaklı *E. coli* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon kriterlerine (CLSI) göre saptanmış, beta laktam direnç fenotipleri ve GSBL üretimi çift disk sinerji testi (ÇDST) ile belirlenmiştir. Bu yöneme göre; 156 *E. coli* izolatının GSBL (+) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda PZR yöntemiyle 156 GSBL (+) *E. coli* izolatından %53.2'sinin TEM tipi beta laktamaz enzimi ürettiği tespit edilmiştir. *E. coli* suşlarında TEM tipi GSBL üretimine sıklıkla rastlanılmaktadır. ÇDST yöntemiyle GSBL (+) olduğu tespit edilen 73 *E. coli* suşunda PZR'la TEM tipi enzim üretimi görülmemiştir. Bu izolatların SHV, CTX-M veya OXA gibi farklı tiplerde beta laktamaz taşıyabilecekleri düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki *E. coli* izolatlarında PZR'la TEM tipi beta laktamaz oranı %53.2 iken aynı hastaneden farklı tarihlerde sağlanan *E. coli* izolatlarında yapılan başka bir çalışmada TEM tipi beta laktamaz oranının %34.05 olduğu bildirilmiştir⁷¹. Aynı hastanede yapılan iki ayrı çalışmada TEM tipi beta laktamaz oranının farklılığı izolatların farklı tarihlerde toplanması veya çalışılan izolat sayısının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Taşlı ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada TEM tipi beta laktamaz direnç oranını %52.7 olarak belirlemişlerdir⁷². Bu oran belirlediğimiz TEM tipi beta laktamaz oranına (%53.2) yakın bir

değerdir. Taylant'ta 2008 yılında Pongpech ve arkadaşları yaptıkları benzer bir çalışmada GSBL pozitifliğini %31, TEM tipi beta laktamaz üretim oranını %78 olarak saptamışlardır⁷³. 2007 yılında Asya-Pasifik SENTRY çalışmasında *E. coli* izolatlarının GSBL pozitiflik oranı %33.3 ve TEM beta laktamaz oranı ise %78 olarak bildirilmiştir⁷⁴. Gram negatif hastane izolatlarında yeni beta laktamlara direnç ve GSBL sıklığı ile ilgili yapılan HİTİT projesinin sonuçlarına göre *E. coli* izolatlarının %26'sının GSBL ürettiği saptanmış ve bunlarda % 49.4 TEM tipi beta laktamaz varlığı tanımlanmıştır.

GSBL epidemisi başlangıçta hastanelerle sınırlı gözükmekteyken, toplumdan kazanılmış enfeksiyonlardaki karşımıza sıklıkla çıkmaktadır. Toplumdan kazanılmış enfeksiyonları araştırmak amacıyla dışkıdan izole edilen *Enterobacteriaceae* kökenlerinde GSBL sıklıkları ve tipleri araştırılmış ve *E. coli*'de GSBL pozitifliğinin %18.4 ve bu suşlarda TEM tipi beta laktamaz direnç oranının %76.3 olduğu bildirilmiştir⁷⁵.

Üriner sistem enfeksiyonları, toplumda ve hastanede yatan hastalarda sık görülen ve antibakteriyel ilaçların en sık kullanıldığı enfeksiyonlardır. Araştırmamızda idrar kaynaklı *E. coli* suşlarının oranı %81'dir. *E. coli* izolatlarının kaynakları çoğunlukla nefroloji (%15) ve üroloji (%18) kliniklerindendir. Materyal dağılımına göre idrar örneklerinden izole edilen suşların %51'inde TEM pozitif *E. coli* suşu saptanmıştır. İdrardan izole edilen GSBL (+) suşların %59.5'i poliklinik kaynaklı, %40.5'i klinik kaynaklıdır; sırasıyla %53 ve %47 TEM tipi beta laktamaz ürettiği tespit edilmiştir. Öztürk yapmış olduğu toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarında GSBL (+) *E. coli* suşlarında yaptığı çalışmada bu oranı %61 olarak bulmuştur⁷⁶. İki ayrı çalışmanın idrar örneklerindeki GSBL pozitiflik oranı birbirine yakın değerlerde bulunmuştur.

Öksüz ve ark. iki aylık dönemde pediatri poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole ettikleri GSBL (+) *E. coli* suşlarında yaptıkları çalışmada, TEM tipi beta laktamaz oranını %82 olarak saptamışlardır⁷⁷. Çalışmamızda; poliklinik hastalarındaki TEM tipi beta laktamaz üretim oranı %58, yaş gruplarına göre pediatri grubunda TEM tipi beta laktamaz üretim oranı %65.5, idrar örneklerinden izole edilen suşlardaki TEM tipi beta laktamaz üretim oranı %53 olarak saptandı. Öksüz ve ark. çalışmalarına göre pediatri bölümünde tespit ettiğimiz TEM tipi beta laktamaz üretim oranı (%53) daha düşük bulunmuştur.

Gerek beta laktamazlara gerekse diğer antimikrobiyal direnç mekanizmalarına bağlı ortaya çıkan, antimikrobiyallara direnç sorunu özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalarda önem taşımaktadır. *Escherichia coli* hastane enfeksiyonunda ve son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlarda önemli bir mikroorganizmadır. Bu direnç hastane kaynaklı kökenlerde daha fazla gözlenirken, toplum kökenli bakterilerde de direnç artışı gözlenmektedir. Araştırmamızda poliklinik kaynaklı GSBL(+) *E. coli* izolatlarında %56 ve çeşitli kliniklerden toplanan izolatlarda %50 oranında TEM tipi beta laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Her iki grup TEM tipi beta laktamaz enzim varlığı açısından değerlendirildiğinde poliklinik kaynaklı *E. coli* izolatlarının klinikten gelen izolatlara göre daha yüksek oranda TEM tipi beta laktamaz ürettikleri gözlenmiştir.

Araştırmamızdaki GSBL (+) izolatların %63 (%51 TEM tipinde beta laktamaz)'ünü kadın kaynaklı izolatlar, %37 (%58 TEM tipinde beta laktamaz)'sini erkek kaynaklı izolatlar oluşturmaktadır (Grafik 4). TEM tipi beta laktamaz üretim oranı, erkek kaynaklı izolatların bu tip enzimi kadın kaynaklı izolatlara göre daha fazla ürettikleri gözlenmiştir. Erkek cinsiyetle GSBL üretimi arasında ilişki bulunduğu başka bir çalışmada

gösterilmiştir⁷⁶. Çalışmamızda erkek cinsiyetle TEM tipi beta laktamaz üretimi arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

GSBL oluşturan *E. coli* suşlarının fenotipik doğrulama testlerinde GSBL varlığını maskeleyebilen, böylece yanlış negatif sonuçlara neden olan diğer beta laktamazlara sahip olabilmektedirler⁷⁸. Tarama testi sonuçlarına göre GSBL (+) 156 suşun 141'i (%90.1) MİK fenotipik doğrulama testiyle pozitif (dirençli) bulunmuştur (amoksisilin ve sefotaksim). Kiremitçi ve ark. 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada bu oranı, kendi çalışmalarında %86.7 olarak saptamışlardır⁷⁹. Ancak 156 örnekte çalışma grubuna alınmış ve fenotipik doğrulama testinde GSBL negatif bulunan 15 suşdan 8'inde TEM tipi beta laktamaz üretimi saptanmıştır.

Pek çok ülkede antimikrobiyal ilaçların hayvan yemlerine katılması kontrolsüz bir biçimde devam etmektedir. Örneğin seftiofur insanlarda kullanılmayan bir sefalosporindir. İnsanlarda seftiofur ve diğer bazı sefalosporinlere dirençli izolatlar saptanmıştır. İnsanlarda etkin olan bakterilere kontamine besin maddeleri ve plazmid transferiyle direnç aktarılmaktadır. Bu antibiyotik savurganlığı sonucunda seleksiyonla dirençli ve çoğul dirençli suşlar toplumda yayılabilme olanağını bulmaktadır⁸⁰.

Bakterilerde direnç gelişimi antibiyotik kullanımıyla yakından ilişkilidir. Bu yüzden antibiyotik kullanımına özen gösterilmeli ve hastanedeki dirençli bakterilerin özellikleri dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ

Antibiyotik kullanımı hasta, hastane ve toplumun biyolojik çevresini olumsuz etkilemekte ve dirençli türlerin oluşmasına neden olmaktadır. Son yıllarda bilinçsiz antibiyotik kullanımı antibiyotiklere doğal dirençli enterokokların fırsatçı etkenler olmasına yol açmaktadır.

Enterobakteriler zaman içinde beta laktam antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan olan GSBL direnci antibiyotik direncinin kazanılmasında daha etkili bir mekanizma olarak önemini korumaktadır.

Araştırmamızda beta laktam antibiyotiklere karşı özellikle toplum kaynaklı TEM tipi beta laktamaz direnç oranının diğer ülkelerle kıyaslandığında önemli bir oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak ülkemizde ve araştırma alanı olan hastanede antibiyotik seçimi ve kullanımına özen gösterilmelidir. Antibiyotik seçiminde, hastanelerdeki bakteri çevresi'nin direnç özellikleri dikkate alınmalıdır.

7. ÖZET

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji testi (ÇDST) ile belirlenmiş, 156 *Escherichia coli* izolatu kullanıldı. Bu izolatlardan kaynatma yöntemiyle DNA elde edildi. 156 *E. coli* suşunda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) TEM tipi beta laktamaz varlığı araştırılmıştır. PZR sonuçlarına göre, 156 GSBL(+) *E. coli* suşunun %53.2'sinde TEM tipi beta laktamaz varlığı belirlendi. GSBL üretiminin değerlendirilmesi klavulanik asit varlığında ya da yokluğunda amoksisilin ve sefotaksim kullanılarak mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı. Sonuçlarımız GSBL'in *E. coli*'de ifade edildiğini göstermektedir.

8. SUMMARY

156 of *Escherichia coli* isolates which have been determined extended spectrum beta lactamase-(ESBL) production by double disk synergy test in Gazi University, Clinical Microbiology Laboratory were used in this study. From this isolates DNA was isolated by boiling technique. It is investigated the presence of TEM type beta lactamase by polymerase chain reaction (PCR) in 156 of *E. coli* strains. According to polymerase chain reaction results, it was determined 53.2% TEM type beta lactamase in 156 of *E. coli* strains. Confirmation of ESBLs production was carried out by the microdilution assay using amoxicillin and cefotaxime in the presence and absence of clavulanic acid. Our results indicate that the majority of ESBLs were expressed in *E. coli*.

9. KAYNAKÇA

1. Jones RN, Pfaller MA. Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:379–88.
2. Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH, Lautenbach, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23(5):254-60.
3. Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2): 410- 414.
4. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on ecological balance of human microbiota. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(2):101-114.
5. Bennet R et al. Fecal bacterial microbiota of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotics regimens. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5(5):533- 539.
6. Harvey RA, Champe PA, Lippincott's Illustrated Reviews. In: Anđ Ö çeviri editör. *Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri 2006.
7. Erdem B, Enterobacteriaceae. İçinde: Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd; 1999. s. 472- 485.

8. Töreci K, Escherichia Türleri. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri; 2002; 2: s.1564-1575.
9. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları.10. Baskı 2000. s. 13-17.
10. Donenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Clin Invest 2001; 107(5):539- 548.
11. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in β lactamases and extenden spectrum β lactamases BMJ 2003; 327(7425):1209.
12. Töreci K. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları. İçinde: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, editörler. Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2003. s. 15-30.
13. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. VIII. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş; 1998. s.201-239.
14. Microbiology: a human perspective/ s:57-63.
15. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane Enfeksiyonları Derg 1997; 1:38-45.

16. Ünal S. Antibiyotik Kullanımının Sosyal Yönü. Ankem Derg 2003; 17: 136-137.
17. Öztürk R. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar Sempozyum Dizisi 2008; 6: 1-16.
18. Schaaff F, Reipert A, Bierbaum G. An elevated mutation frequency favors development of vancomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(11): 3540-3548.
19. LeClerc JE, et al. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens Science 1996; 274(5290): 1208-1211.
20. Maiden MC. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. Clin Infect Dis 1998; 27(1):12-20.
21. Salyers AA, Amabile-Cuevas CF. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41(11): 2321-2325.
22. Murray P, Rosenthal K. Basic principles of medical microbiology. Medical microbiology. 2005:Missouri.
23. Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol Rev; 1994; 58(3): 563-602.

24. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* genetic basis. Microbial Rev. 1987; 51(1):88-134.
25. Davison J. Genetic Exchange between bacteria in the environment. Plasmid 1999; 42(2):73-91.
26. Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(2):277-301.
27. Rice L.B. Tn919 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother, 1998; 42(8):1871-1877.
28. Salyers AA. Et al. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol Rev 1995; 59(4):579-590.
29. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Appl Environ Microbiol 2001; 67(1):22-32.
30. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding protein mediated resistance of β -laktam antibiotics. Trends Microbiol 1994; 2:361-36.
31. Gür D, Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri; 2002 s:93-182.

32. Livermore DM, Davy KW. Invalidity for *Pseudomonas aeruginosa* of an accepted model of bacterial permeability to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(5): 916-921.
33. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4):557-584.
34. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanism of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nature Rev Microbiol 2005; 3:711-721.
35. Özsoy FM, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A, ve ark. Genişletilmiş Spektrumlu Beta-laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar. Flora Dergisi 2001; 6: 3-21.
36. Karakoç AE. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Bakterilerde Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Yorumlama Kriterleri. İçinde: Arman D, Leblebicioğlu H, editörler. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Mikroorganizmalar ve Direnç Sorunu, İnfeksiyon Hastalıkları Tedavi Dizisi 9. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. s:33-48.
37. Bush K. The Evolution of Beta Lactamases. Mikrobiyoloji Bülteni 2000; 34:7-21.
38. Gür D. GSBL'lerin genel özellikleri ve GSBL tipleri: Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamazlar. İçinde: Köksal İ, editör. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. s. 5-12.

39. Medeiros AA. Cooperative evolution of mechanisms of beta lactam resistance. Clin Microbiol Infect 2000; 3: 3-5.
40. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA, et al. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
41. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, Fridkin SK, Jevitt L, McGowan JE, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. J Clinical Microbiol 2003; 41 (7): 3142-3146.
42. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç. Hastane Enfeksiyonları Derg 2001; 5: 210-229.
43. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J Antimicrobial Chemotherapy 1998; 41(1):25-41.
44. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. Ankem Derg 1997; 11:205-207.
45. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE, et al. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10(PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1637-1644.

46. Bradford P. Extended spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-951.
47. Bush K, Jacoby GA. Nomenclature of TEM beta lactamases. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 1-3.
48. Gür D. Beta-laktamazlar: Temel Tıptan Kliniğe. Hacettepe Tıp Derg 2002; 33(2): 102-109.
49. Akova M. Dikkat: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) var. Ankem Derg. 2004; 18(ek 2): 98-103.
50. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clinical Microbiology Infection 2001; 7: 597-608.
51. Jasser-Al AM. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global problem. Kuwait Medical J 2006; 38 (3): 171-185.
52. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. J Clin Microbiol 1997; 35:2061-2067.
53. <http://www.lahey.org/studies>

54. Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L, et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J of Antimicrobial Chem 2005; 56: 52–59.
55. Paterson DL, Bonomo RA, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews 2005; 657–686.
56. Gülay Z. ESBL'lerin Tanı Yöntemleri. İçinde: Köksal İ, editör. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. s.13-25.
57. Gülay Z. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. Toraks Derg 2002; 3(1): 75-88.
58. Durmaz R. Direnç Gelişimini Önlemede Moleküler Mikrobiyolojinin Katkısı. Ankem Derg 2009; 23(Ek 2): 111-115.
59. Esen Ş. ESBL'lerin Epidemiyolojik Özellikleri. İçinde: Köksal İ, editör. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. s.26-30.
60. Abbasoğlu U, Özçelik B, Özkan S, Kurtuluş Ülküer M, Kaynak F. Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı, Ankara 2005.
61. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin, Stewart C, Hill B, Mederios AA, Tenover FC, et al. Evolution of Extended-Spectrum Beta-Lactam Resistance (SHV-8) in a Strain of *Escherichia coli*

during Multiple Episodes of Bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 1997; 647–653.

62. Segatore B, Setacci D, Perili M, et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Enterobacteriaceae producing complex beta-lactamase patterns including extended-spectrum enzymes. J Antimicrob Agent 2004; 23:480-6.

63. Günaydın M, Esen Ş, Saniç H, Leblebicioğlu H: Hastane infeksiyonları, Simad yayınları. Samsun 2002 Vol.1, s.191-199.

64. Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1131-1136.

65. George JA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:164-169.

66. Rodriguez-Barrio J, Navarro MD, Romeo L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clinical Microbiology 2004; 1089-1094.

67. Coque TM, Baquero F, Canton R, et al. Increasing Prevalence of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Europe. Review articles Eurosurveillance 2008;13: 47.

68. Delialioğlu N, Öcal ND, Emektaş G, ve ark. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinde Geniş Spektürlü Beta Laktamaz Oranları. Ankem Derg 2005; 19(2): 84-87.

69. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan JE, Raney P, Tenover FC, et al. Mechanism of Decreased Susceptibility to Cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 3829-3836.

70. Bozkurt H, Kurtoğlu MG, Aygöl K, Bayram Y, Berktaş M, ve ark. Nozokomiyal Kaynaklı *Klebsiella Pneumoniae* ve *Escherichia coli* İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi. *Turkish Medical J* 2007; 1: 150-153.

71. Bali EB: *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşlarında plazmit veya kromozomal kaynaklı genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması ve moleküler yönden incelenmesi, Doktora Tezi, Ankara. Gazi Üniversitesi, 2007.

72. Taşlı H, Bahar İH, et al. Molecular Characterization of TEM- and SHV-Derived Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Hospital-Based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 162-167.

73. Pongpech P, Naenna P, Taipobsakul Y, Tribuddharat C, Srifuengfung S, et al. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Class 1 Integron Integrase Gene *INT1* in *Escherichia coli* from THAI patients and healthy adults. *Mahitol ac* 2008; 39(3): 425-433.

74. Bell JM, Chitsaz M, Turnidge JD, Barton M, Walters LJ, Jones RN, et al. Prevalence and Significance of a Negative ESBL Confirmation Test Result after a Positive ESBL Screening Test Result for Isolates *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Result from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J Clin Mic* 2007; 1478-1482.

75. Ünver D, Küçükbasmacı Ö. Salgın dışı durumlarda dışkıda GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin prevalansının saptanması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2008; 38 (3-4): 126-131.

76. Öztürk S. Toplum Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonlarında GSBL (+) *E. coli* İzolatlarında Risk Faktörleri ve Moleküler Tiplendirme. Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2007.

77. Öksüz L, Gürler N, Akıncı N, Şirin A, ve ark. İki aylık bir dönemde Pediatrik poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole edilen GSBL oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşları. Ankem Derg 2008; 22(1): 14-19.

78. Tanır G, Göl N. Antibiyotik Direnci. Klimik Derg 1999; 12(2):47-54.

79. Kiremitçi A, Durmaz G, Aybey A, Us T, Akgün Y, ve ark. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında NCCLS/CLSI tarama ve fenotipik doğrulama yöntemleriyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması. Osmangazi Tıp Derg 2006; 28(2): 73-79.

80. Göker G. Poliklinik Hastalarının Çeşitli Klinik Örneklerinden Etken Olarak İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* cinsi bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2007.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Mürvet

Soyadı: Aksöz

Doğum yeri ve yılı: Polatlı, 1 Nisan 1966

Eğitim:

2009, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans

1991, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Bölümü

1984, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Lisesi-Tıbbi
Laboratuvar Bölümü.

Yabancı Dili: İngilizce orta düzeyde

TEŐEKKÖR

Çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarıyla ve tez çalışmam süresince yardımlarıyla beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç.Dr. Melahat Kurtuluş Ülküer'e yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Ufuk Abbasoğlu'na ve çalışmalar sırasında destek ve yardımlarından dolayı Araştırma görevlileri Fatma Kaynak Onurdağ ve Selda Özgen'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda katkı ve yardımlarından dolayı Gazi Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Nedim Sultan'a ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı eşim Zeki Aksöz ve kızlarım Gediz Aksöz ve Deniz Aksöz'e teşekkür ederim.