

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Enterobacteriaceae İZOLATLARINDA CTX-M TİPİ GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU β -LAKTAMAZ (GSBL)
ENZİM POZİTİFLİĞİ VE DAĞILIMI

Bio. Cihangir GÜLAMBER
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

Tez No: 2009-025
2009-AFYONKARAHİSAR

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Enterobacteriaceae İZOLATLARINDA CTX-M TİPİ GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU β -LAKTAMAZ (GSBL) ENZİM POZİTİFLİĞİ VE
DAĞILIMI

Bio. Cihangir GÜLAMBER

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

Tez No: 2009-025


B.A.P.K. No: 07.tıp.14


2009-AFYONKARAHİSAR


KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.08.2009


Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
ÜYE


Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE
ÜYE


Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN
ÜYE

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Cihangir GÜLAMBER'in "*Enterobacteriaceae* İzolatlarında CTX-M Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Enzimi Pozitifliği ve Dağılımı" başlıklı tezi 08.09.2009 günü saat 09.30'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Zehra BOZKURT
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama Araştırma Hastanesi'nde izole edilen toplam 100 adet nozokomiyal suş, laboratuvarında konvansiyonel yöntemlerle identifiye edilmiş ve antibiyogramları yapılmış, daha sonra otomatize sistemlerle (Phoenix®, Bekton Dickinson Diagnostics), MicroScan® (Dade Behring Inc.) doğrulamaları yapılmış, ardından PCR yöntemi ile CTX-M kodlayan suşlar belirlenmiş, daha sonrasında ise sekanslama yöntemi ile CTX-M alt tipleri araştırılmıştır.

Bu tezin seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e,

Yetişmemde emekleri olan, verdikleri derslerle bilimsel vizyonumun gelişmesinde emekleri olan Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE, Sayın Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye, Medizinische Universität Graz, Molecular Diagnostics Laboratory & Reseach Unit for Molecular Diagnostics yöneticisi Sayın Prof. Dr. Harald H. KESSLER'e ve özellikle moleküler çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a,

Tez çalışmam sırasında materyallerin toplanmasından, çalışmanın son şeklini almasına kadar, bütün aşamalarda unutulmaz yardımları için, adlarını yazamadığım değerli arkadaşlarıma,

Tahsil hayatıma gösterdikleri saygı, hoşgörü ve sabır için sayın müdürlerim Burcu TORUN ve Turan TORUN'a ve değerli çalışma arkadaşlarıma,

Bugünlere ulaşıncaya kadar hayatımın her anında, şefkat, ilgi ve desteklerini yanımda bulduğum annem Filiz GÜLAMBER ve babam Cavit GÜLAMBER'e;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim...

Bio. Cihangir GÜLAMBER

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	V
TABLOLAR DİZİNİ.....	VII
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	5
2.1.1. Genel Özellikler.....	5
2.1.2. Morfoloji.....	5
2.1.3. Yapı.....	5
2.1.3.1. Hücre Yapısı.....	6
2.1.3.2. Antijen Yapıları.....	8
2.2. GSBL'ler.....	9
2.2.1. β -laktamazların İsimlendirilmesi.....	11
2.2.2. GSBL Tipleri.....	13
2.2.2.1 TEM'den Köken Alan GSBL'ler.....	13
2.2.2.2. IRT.....	13
2.2.2.3. SHV'den Köken Alan GSBL'ler.....	14
2.2.2.4. OXA'dan Köken Alan GSBL'ler.....	14
2.2.2.5. CTX-M.....	14
2.2.2.6. PER-1.....	16

2.2.3. GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı.....	16
2.2.3.1. Kombine Disk Yöntemi.....	17
2.2.3.2. Çift Diskli Sinerji Testi.....	17
2.2.3.3. Üç Boyutlu Test.....	18
2.2.3.4. Dilüsyon Yöntemleri.....	19
2.2.3.5. Klavulanik Asit Kombinasyonlu Disk Difüzyon Testleri.....	19
2.2.3.6. E Test Yöntemi.....	19
2.2.3.7. Otomatize Sistemler.....	20
2.2.3.8. Moleküler Yöntemler.....	20
2.2.4. Dünyada GSBL'ler.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç ve Malzemeler.....	23
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	23
3.1.2. Kullanılan Antibiyotikler.....	23
3.1.3. PCR İşlemleri için Kullanılan Cihazlar.....	23
3.1.4. Elektroforez İçin Kullanılan Gereçler.....	24
3.1.5. Kullanılan Diğer Gereçler.....	24
3.2. Yöntemler.....	24
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	24
3.2.2. Phoenix® (Bekton Dickinson Diagnostics) Sistemi ile Doğrulama..	24
3.2.3. MicroScan® (Dade Behring Inc.) Sistemi ile Doğrulama.....	25
3.2.4. QUICOLOR ES® Test Besiyeri ile Doğrulama.....	26
3.2.5. Tüm CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması.....	27
3.2.5.1. Hücrelerin Parçalanması.....	27
3.2.5.2. Primerlerin ve Master Mix'lerin Hazırlanması.....	28
3.2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PolymeraseChainReactionPCR)..	28

3.2.5.4. Elektroforez Jelinin Hazırlanması.....	29
3.2.5.5. Örneklerin Yüklenmesi.....	29
3.2.5.6. Yürütme (Elektroforez).....	30
3.2.5.7. Görüntüleme.....	30
3.2.6. Grup-1 CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması... 30	
3.2.7. Grup-2 ve Grup-9 CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması.....	31
3.2.8. Kalan Suşların Kontrol Edilmesi.....	32
3.2.8.1. Hücrelerin Parçalanması.....	32
3.2.8.2. Primerlerin Hazırlanması.....	32
3.2.9. Amplikonların Sekanslamalarının Yapılması.....	33
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	52
EKLER	64

SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>SİMGE</u>	<u>KAVRAM</u>
AZT	Aztreonam
CAZ	Seftazidim
CİP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical laboratory Standart Institute
CN	Gentamisin
CPD	Sefpodoksim
CRO	Seftriakson
CTX	Sefotaksim
ÇDST	Çift disk sinerji testi
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksi ribonükleik asit
EMB	Eozin-metilen mavisi
FEP	Sefepim
FOX	Sefoksitin
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta-laklamaz
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ S	Hidrojen sülfür gazı
IPM	Imipenem
KCN	Potasyum siyanid
L	Litre
LPS	Lipopolisakkarit
M Koloni	Mukoid (Sümüksü) koloni
Mg	Miligram
MHA	Mueller-Hinton Agar

SİMGEKAVRAM

ml

Mililitre

mm

Milimetre

nmol

Nanomol

ONPG

Ortho-Nitrofenil- β -galaktosid

PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu

PFGE

Pulse Field Gel Electrophoresis

pH

Power of Hydrogen (Asidite)

pI

İzoelektrik nokta

pmol

Pikomol

R Koloni

Rough (Düzensiz) koloni

S Koloni

Smooth (Düz) koloni

SS jelozu

Salmonella-Shigella jelozu

SXT

Trimetoprim-Sulfametoksazol

TBE

Tris-Borik Asit-EDTA

TOB

Tobramisin

TZP

Piparisilin tazobaktam

TSI Agar

Triple Sugar Iron Agar

V

Volt

°C

Santigrat derece

 μ g

Mikrogram

 μ l

Mikrolitre

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Beta-laktamaz sınıfları	12
Tablo 2: CTX-M enzimleri ve alt grupları	15
Tablo 3: GSBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon zону ve MİK değerleri.....	18
Tablo 4: Üniуersal CTX-M master mix'in hazırlanma oranları.....	28
Tablo 5: PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	29
Tablo 6: CTX-M-1 master mix'in hazırlanma oranları.....	30
Tablo 7: CTX-M-2 master mix'in hazırlanma oranları.....	31
Tablo 8: CTX-M-9 master mix'in hazırlanma oranları.....	31
Tablo 9: CTX-M-1 tekrar master mix'in hazırlanma oranları.....	32
Tablo 10: Olguların cinsiyetlerine göre ve yaşlarına göre dağılımları.....	34
Tablo 11: Olguların yaş gruplarına göre dağılımları.....	35
Tablo 12: GSBL pozitif <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının etkenlere göre dağılımları.....	35
Tablo 13: İdentifikasyon yöntemlerinin birbirleri ile uyumluluk karşılaştırmaları.....	36
Tablo 14: İncelenen örneklerin tiplerine göre dağılımları.....	37
Tablo 15: Suşlara göre % antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	38
Tablo 16: Mikroorganizmalara göre β laktamaz dağılımları.....	41
Tablo 17: Suşlara göre beta-laktamaz dağılımları.....	41
Tablo 18: Ülkemizde nozokomiyal kökenli <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> suşlarında GSBL sıklığını araştıran çeşitli araştırmalar.....	44

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, günümüzde en önemli nozokomiyal patojenler arasındadır. Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Baskın CTX-M genotiplerinde görülen dağılım, coğrafyaya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Aralarında İngiltere ve Hindistan'ın da bulunduğu birçok ülkede CTX-M 15 çok yaygın görülmekte iken, Latin Amerika'da CTX-M 2, İspanya ve Uzakdoğu'da ise CTX-M 9 ve CTX-M 14 baskındır. Bu çalışmada; Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama Araştırma Hastanesi'nde farklı kliniklerden laboratuara gönderilen nozokomiyal suşlar, laboratuvarında konvansiyonel yöntemlerle identifiye edilmiş, daha sonra otomatize sistemlerle (Phoenix[®], Becton Dickinson Diagnostics), MicroScan[®] (Dade Behring Inc.) doğrulanmış, GSBL üretimleri çift disk sinerji yöntemi ile araştırılmış ve antibiyogramları belirlenmiştir. İncelenen 100 GSBL pozitif suştan 65 tanesi CTX-M universal primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte grup spesifik primerlerle yapılan PCR reaksiyonları sonucu 61 suş CTX-M 1 (61.0%), 1 suş CTX-M 9 (1%) ve 1 suş CTX-M 2 (1%) yönünden pozitif olarak saptanmıştır. PCR reaksiyonları ile 50/82 *Escherichia coli* (% 61,0), 12/14 *Klebsiella pneumoniae* (% 85,7), ve 1/2 *Citrobacter freundii* (% 50,0) izolatları CTX-M pozitif bulunurken, *Morganella morganii* ve *Enterobacter cloacae* izolatlarında pozitiflik gözlenmemiştir. Daha sonra ampikonlar CTX-M tiplerinin belirlenmesi için sekanslanmış ve gen bankası verileri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, CTX-M 1 pozitif suşlardan sırasıyla CTX-M 15 (31 suş), CTX-M 28 (17 suş), CTX-M 3 (9 suş), CTX-M 22 (2 suş), CTX-M 33 (2 suş), CTX-M 42 (2 suş), homolojileri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Afyonkarahisar bölgesindeki nozokomiyal suşlardan en sık CTX-M 15, ikincil sıklıkta da nadiren gözlenen CTX-M 28 formunun varlığı belirlenmiş olup bu verilerin daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enterobacteriaceae, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, GSBL, blaCTX-M-1, PCR, sekanslama.

SUMMARY

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing members of the *Enterobacteriaceae* family are important nosocomial pathogens. CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are now the most important cause of resistance to beta-lactam antibiotics in *E. coli* and are reported worldwide with increasing frequency. Dominant CTX-M genotype varies geographically. CTX-M 15 dominates in many countries including the UK and India whereas CTX-M 2 is the most common genotype in Latin America and CTX-M 9 and CTX-M -14 in Spain and the Far East.

In this study; a total of 100 consecutive ESBL positive nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* collected from Afyon Kocatepe University Hospital were screened for production of ESBLs by double disk synergy test and determined the susceptibility to antibiotics. Then this results confirmed by Phoenix[®] (Bekton Dickinson Diagnostics) and MicroScan[®] (Dade Behring Inc.). Among 100 ESBL positive strains 65 were positive for CTX-M by PCR with universal primers. However when group specific primers were used 61 strains were positive for CTX-M 1 (61.0%), 1 strain was positive CTX-M 9 (1%) and 1 strain was positive for CTX-M 2 (1%). Polymerase chain reaction detected bla(CTX-M) in 50/82 (60,97%) *Escherichia coli*, 12/14 (85,71%) *Klebsiella pneumoniae*, and 1/2 (50,0 %) *Citrobacter freundii* isolates with the ESBL phenotype. But there was no positive isolate detected in *Morganella morganii* and *Enterobacter cloacae*. Amplicons were sequenced to determine the CTX-M types and sequences were compared to gene bank. Among CTX-M 1 positive strains sequence results showed higher homology to CTX-M 15 (31 strains), CTX-M 28 (17 strains), CTX-M 3 (9 strains), CTX-M 22 (2 strains), CTX-M 33 (2 strains), CTX-M 42 (2 strains).

As a result; The most common CTX-M type was CTX-M 15, the second common CTX-M type was CTX-M 28 related among strains isolated in Afyonkarahisar Turkey. Further studies will be necessary to confirm our finding.

Key words: *Enterobacteriaceae*, ESBLs, blaCTX-M, blaCTX-M 1, extended spectrum β lactamase, PCR, sequencing.

1.GİRİŞ

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir (1). Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL) (2,3). GSBL'ler, Gram-negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir (4). Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması, son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır (5).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, penisilin ve sefalosporinlere olduğu gibi, oksimino beta-laktamlara da direnç oluşturan plazmid aracılı enzimlerdir (6,7). Gram negatif patojenlerde beta-laktam direncinde betalaktamaz oluşturma en önemli faktördür (8). Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler; beta-laktamaz enzimleri tarafından hidrolize edilerek etkisiz şekle dönüşmektedir. Tanımlanan en önemli beta-laktamaz enzim grupları plazmidlerle kodlanan sefalosporinaz, metallo-beta-laktamaz ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL) (3).

Gram negatif bakterilerin çoğunluğu kromozomal veya plazmid kökenli kodlanan beta-laktamaz enzimleri üretirler (9). GSBL'lerin büyük bir kısmı TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 grubu enzimlerdir. Geri kalanlar CTX-M tipi enzimler veya OXA'lardan GSBL spektrumuna sahip olanlar veya henüz gruplandırılmayan GSBL enzimleri olarak bilinmektedir. GSBL'ler tüm dünyada yayılmayı sürdürdüğü için antibiyotik tedavilerinin planlanmasında etkenin GSBL pozitif olup olmadığının bilinmesi büyük önem taşımaktadır (6).

GSBL üreten kökenlerle enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz vb. kateter uygulamaları türünden çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı durumlarda artmaktadır (9). GSBL üreten bakteriler, hastane enfeksiyonu etkenleri içinde sıklıkla artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır.

GSBL pozitif kökenlerin saptanmasında çok değişik yöntemler kullanılabilir. Bunlar; çift disk sinerji testi (ÇDST), üç boyutlu test, kombinasyonlu mikrodilüsyon testleri, kombinasyonlu disk difüzyon testleri, E-test, otomatize sistemler ve moleküler yöntemlerdir (10). GSBL üreten kökenlerin penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyogramda duyarlı bulunabilmeleri ve bu antibiyotiklerin kullanıldığı tedavilerde sorunlarla karşılaşılması nedeniyle, bu enzim üretiminin gösterilmesinin gerekli olduğu bildirilmektedir (11).

Bu çalışmada; en sık hastane enfeksiyonlarına yol açan *Enterobacteriaceae* grubunda GSBL varlığı ve bunlar içinde CTX M tipi direnç enzimlerinin varlığı ve alt türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae*

2.1.1. Genel Özellikler

Enterobacteriaceae; insanda enfeksiyon etkeni olan, sık izole edilen, çok sayıda bakteri cinsini ve türünü içeren bir bakteri ailesine verilen addır. *Enterobacteriaceae*, büyük tıbbi önemi olan bir bakteri ailesidir. Bu ailedeki bakterilerin birçoğu insan ve hayvanların barsak dışı floralarında, bitkilerde, toprakta, suda; patojen, kommensal ve saprofit olarak bulunurlar (13). İnsanda septisemi, menenjit, cerrahi yara enfeksiyonları, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları... gibi hemen her doku ve organı tutan enfeksiyonlarda, bu aileden bir bakteri etken olarak izole edilebilir.

Enterobacteriaceae ailesindeki önemli cinsler:

- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Citrobacter*
- *Providencia*
- *Enterobacter*
- *Proteus*
- *Yersinia*
- *Morganella*
- *Serratia*

2.1.2. Morfoloji

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler gram negatif, genellikle homojen boyanan, paralel kenarlarla 2–3 µm boyunda, 0,5–0,6 µm eninde, uçları yuvarlak bakterilerdir. Aside dirençli boyanmazlar ve içlerinde granül görülmez (13).

2.1.3. Yapı

Bu kadar çok cins ve türün bulunduğu bir bakteri grubunda hemen her özellik için farklılık gösteren bakterilerin bulunması doğaldır. Nitekim *Yersinia pestis* ve *Y.pseudotuberculosis* daha küçük, kokobasil şeklinde bakterilerdir ve uçları daha koyu, ortası açık boyanır. *Klebsiella* cinsindeki bakteriler ise daha uzun ve kalındırlar

(12). *E.coli*, özellikle idrarda ve eski kültürlerinde uzun flamantlar oluşturabilir. Bu ailedeki bakteriler spor oluşturmazlar.

Shigella, *Klebsiella* gibi bazı cinsler, *Yersinia* cinsindeki *Y.pestis* gibi bazı türler, *Salmonella* cinsindeki bazı serovarlar hareketsiz, bunun dışındaki cins ve türler kirpiklerle (flagella) hareketli bakterilerdir. Polar ya da lateral kirpikli olabilen *Tatumella* cinsindekiler hariç peritrik kirpiklidirler. *Klebsiella* cinsindeki bakteriler belirgin bir kapsül ve zengin besiyerinde mukoid koloni olutururlar (13).

Kapsül oluşturma, diğer cinslerde önemli bir özellik değilse de yeni izole edilen *Y.pestis*'de ince bir kapsül bulunabildiği gibi, *E.coli*, *Enterobacter* suşlarında da dışta kapsüller bir materyal bulunabilir.

Salmonella cinsinde *Paratyphi B* serovarlarındaki kapsül yapısı kolonilerin mukoid görülmesine yol açacak kadar bol olabilir (12).

2.1.3.1.Hücre Yapısı

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin yapısı diğer gram negatif bakterilerinkine benzer. Sitoplâzma zarı dışında, gram pozitif bakteri hücre duvarındakinden çok daha ince ve esnek olan peptidoglikan tabaka bulunur. Gram pozitif bakterilerden farklı olarak bu peptidoglikan tabaka dışında periplazmik aralık ve protein içeren dış duvar bulunur.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler fakültatif anaeroptur, oksijen varlığında olduğu gibi anaerop ortamda da ürerler. İnsan ve hayvandan izole edilen türler en uygun 37°C, bitkilerde ve doğada bulunan suşlar daha düşük sıcaklıklarda ürerler ve üreme sıcaklık sınırları 15°-44°C olarak kabul edilebilir (13). Bazı türler 0°C'ye yakın sıcaklıkta da yavaş üreyebilir (örneğin: *Yersinia enterocolitica*).

Bu ailedeki bakteriler buyyon ve jeloz gibi ayrıca bir zenginleştirici ilave edilmemiş laboratuvar besiyerinde güzel ürerler. Buyyon besiyerini 37°C'de 8-12 saatte bulandırmaya başlarlar. Jeloz besiyerinde, 24 saatte düzgün koloni oluşturlar (13).

24 saatte yuvarlak, ortası kalkık, düzgün kenarlı 2-3 mm çapında S (Smooth) şeklinde düzgün koloniler oluşur (Örneğin: *E.coli*). Bazı türlerde koloniler daha geç ve küçük olabilir. Belirli O antijenlerini kaybetmiş suşlar kenarları ve yüzeyi

düzensiz R (Rough) şeklinde koloniler oluşturur (Örn: *Proteus*). *Klebsiella* cinsindeki bakteriler ve bazı *Enterobacter*; *Salmonella Paratyphi B* suşları yüzeydeki kapsül nedeniyle M (Mukoid) koloni oluştururlar. *Serratia* suşlarının kolonileri, özellikle düşük sıcaklıklarda, prodigiosin pigmenti oluşturduklarında kırmızı renkte görülürler. *Enterobacter sakazakii*, *E.agglomerans*, *Escherichia vulneris* suşlarının bir kısmı sarı bir pigment oluşturur. Diğer türlerin jeloz besiyerindeki kolonileri genellikle pigmentsizdir. *Serratia* suşlarının kolonileri, özellikle düşük sıcaklıklarda, prodigiosin pigmenti oluşturduklarında kırmızı renkte görülürler. *Enterobacter sakazakii*, *E.agglomerans*, *Escherichia vulneris* suşlarının bir kısmı sarı bir pigment oluşturur. Diğer türlerin jeloz besiyerindeki kolonileri genellikle pigmentsizdir. Kanlı jelozda bazı suşlar hemoliz oluşturur. MacConkey jelozu, Eozin-metilen mavisi (EMB) jelozu, *Salmonella-Shigella (SS)* jelozu gibi üremelerini kolaylaştıran seçici besiyerleri de vardır. Bu seçici besiyerinde başta laktoz fermantasyonu olmak üzere, belirli biyokimyasal özelliklerine göre farklı koloniler oluştururlar (13).

İdentifikasyon için çeşitli biyokimyasal testler uygulanmaktadır:

- Çeşitli karbonhidratları fermente etme,
- Arginin, lizin, ornitin dekarboksilazı,
- H₂S, İndol, üreaz oluşturma,
- Metil kırmızısı- Voges-Proskauer deneyi,
- Sitratı üreme, KCN'de üreme
- Laktozu geç fermente edenler için ONPG deneyi...

Laktoz fermantasyonu: Bazı türlerin birbirlerinden ayrımı için yararlıdır. *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* laktoz pozitifdir. *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* ve *Yersinia* türleri laktozu fermente etmezler. EMB, TSİ, Klingler İron Agar, Mc Conkey Agar gibi besiyerlerinde laktoz fermantasyonu araştırılabilir (13).

Safra tuzlarına direnç: *Salmonella* ve *Shigella* safra tuzlarına dirençlidir. Buna karşılık normal florada bulunan diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri safra tuzları ile inhibe olurlar.

Hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu: *Salmonella* ve *Proteus* pozitifdir.

Triptofandan indol oluşumu: *E.coli* pozitif, *Klebsiella pneumoniae*'de negatifdir.

Üre hidrolizi: *Salmonella*'da negatif, *Proteus*'da pozitifdir.

Sitratın karbon kaynağı olarak kullanılması: *E.coli*'de negatif, *K.pneumoniae*'de pozitifdir.

Metil kırmızısı reaksiyonu: Glikoz fermantasyonu ile ortam pH'nın 4.5'in altına düşmesidir. *E.coli*'de negatif, *K.pneumoniae*'de pozitifdir.

Voges Proskauer reaksiyonu: Glikoz fermantasyonu ile asetil metil karbinol oluşmasıdır. *E.coli*'de negatif, *K.pneumoniae*'de pozitifdir (13).

1.1.3.2. Antijen Yapıları

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerde dış duvarda "O" antijenleri (Somatik antijenler), kapsül (K) veya yüzey antijenleri, kirpikli suşlarda "H" antijenleri bulunur. Fimbria antijenleri de yüzeyel antijenler arasında incelenebilir (13).

"O" (somatik) antijenleri: dış duvardaki lipopolisakkarit (LPS)'den oluşur. Isıya, alkole ve asite dayanıklı, formaldehite dirençlidir. Polisakkarit yapıdadır. Antiserumda genellikle IgM antikorları ile aglütine olur. Çapraz reaksiyon verebilir. Serotiplendirmede kullanılır. Virulan suşlarda düz yapıdadır. Pasajlama sonrası "O" antijenini kaybeden suşlar R koloni oluşturur (13).

"O" antijeninde üç bölge bulunur:

Region 1: Oligosakkarit yapıdadır. Bakterinin konağa tutunmasını sağlar ve serumun toksik etkisinden bakteriyi korur. Cinsler içinde farklı serotiplerin doğmasına neden olur.

Region 2: Kor polisakkaritinden oluşur.

Region 3: Lipit A kısmıdır.

“H” (Kirpik=Flagella) antijeni; hareketli suşlarda bulunur. Isı, asit ve alkole duyarlı; formaldehite dirençlidir (protein yapı). IgG yapıda antikorlarla aglütinasyon verir. *Escherichieae* ve *Salmonella* serotiplendirmesini sağlar. Normalde O antijenine baskındır. Denatüre edilebilir.

“K” (Kapsül) antijeni; kalın polisakkarit yapıda, *Escherichieae*'da protein yapıdadır. Isıya kısmen duyarlıdır. Bazen “Slime” şeklindedir. O aglütinasyonunu önledikleri için denatüre edilmelidirler. Bazı *S.typhi* ve *Citrobacter* türlerinde ince kapsül şeklinde “Vi” antijeni bulunur.

Virulans Faktörleri:

Adherens faktörleri: Adhesif fimbriyalar, yapışma pilusları, kolonizasyon faktörleri

İnvazyon faktörleri: Dış membrana lokalize proteinler

Ekzotoksinler: Bağırsak epitelyum hücrelerinin işlevini bozarlar. Adenilat ve guanilat siklazı uyarırlar; cAMP üretimi artar. Bunun sonucu olarak yoğun sıvı ve elektrolit kaybı ortaya çıkar (Örneğin: kolera toksini).

Kapsül ve zarf antijenleri de antikorların bakteriye bağlanmasını engelleyerek fagositozu önlerler. Bu ailedeki bazı bakteriler bakteriyosin denilen protein yapıda, başka bazı bakterilerin ölümüne yol açan maddeler oluştururlar (Kolisin, pestisin) (13).

2.2. GSBL'ler

Penisilinin 1941 yılında kullanıma girmiş ve 1944'den başlayarak hızla yaygınlaşmıştır. *S.aureus* suşları arasında penisilin direnci 1944'de %5 iken, 1953'lerde %80'lere ulaşmıştır. Penisilin G'yi hidrolizleyen, beta-laktamaz (penisilinaz) üretimiydi ve plazmidle yayılmaktaydı. Gram negatiflere de etkili olan ampisilin gibi yarı sentetik penisilinler 1960'lı yıllarda, ardından da 1. kuşak sefalosporinler gündeme gelmiştir. Gram negatif bakterilerde 1963'lerin başlarından itibaren geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu plazmidik enzimler yoluyla temosilin dışında tüm penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinler inaktive edilmiştir. Bununla birlikte, 1970 lerin sonunda ve 1980'li yılların başında önce sefamisinler ve 2. kuşak sefalosporinler bulunmuştur.

Ardından, gram negatiflere karşı daha etkili, 3. kuşak sefalosporinler kullanıma girmiştir. Geçen zamanla birlikte, gram negatif bakteriler beta-laktamazlarını modifiye etmiş, TEM-1, TEM-2, SHV-1 de bir veya birkaç aminoasidi değiştirerek bu enzimlerin etki spektrumlarını biraz daha genişletmiş ve genişlemiş etkili beta-laktamazları (GSBL) üretmeye başlamışlardır. Ve en sonunda; ilk GSBL pozitif suş, *K. pneumoniae* olarak 1983'de Almanya'dan bildirilerek, literatürdeki yerini almıştır (2).

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

Son 20 yıldır özellikle gram-negatif bakterilerde sefalosporinlere dirençte öne çıkan mekanizma olan ve klinikte önemli bir sorun haline gelen genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), *Klebsiella Spp.* ve *Escherichia coli*'lerde daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella spp.* ve *Shigella flexneri* de dahil, birçok enterik bakteride bildirilmiştir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *E.coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır (5). Ülkemizde 1992 yılından beri GSBL'ler araştırılmakta ve bildirilmektedir.

Bu enzimler bir iki aminoasit değişikliği ile dar spektrumlu beta laktamazlardan köken alırlar (14). Aktif bölgelerinde serin bulunan, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksiminosefalosporinleri hidroliz edebilen, klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan beta laktamazlardır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır. GSBL üreten bakteriler her zaman aminopenisilinlere (ampisilin veya amoksisilin), karboksipenisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin) ve üreidopenisilinlere (piperasilin, mezlosilin) dirençlidir. GSBL üreten mikroorganizmalar çoğu kez aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer gruptaki antibiyotiklere de dirençlidir.

Bugüne kadar 350'ye yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır (14). Bunların yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (2,3).

2.2.1. β -laktamazların İsimlendirilmesi

β -laktamazların isimlendirilmesinde birden fazla yöntem ve/veya faktör kullanılmaktadır. Bazı enzimler, hedef substratlarına göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları içerdikleri genlere (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bazıları ise keşfeden kişilere göre (HMS) isimlendirilmiştir (15,16). Ancak, bu isimlendirmelerden bazıları, günümüzde geçerliliklerini yitirmişlerdir. Örneğin; SHV, sülfidril variabl'dan kısaltılmış bir isime sahipken, günümüzde SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu açığa çıkmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas*'tan izole edilmiş olan PSE enziminin, artık enterobakterilerde de bulunduğu bilinmektedir (17). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma disiplinleri, Ambler ve Bush-Jacoby-Mederios sınıflandırmalarıdır (17).

Ambler, β -laktamazları nükleotid dizilerine göre moleküler olarak sınıflandırmıştır (Tablo 1). Buna göre;

A Sınıfı: Plazmid kontrolünde olan penisilinaz,

B Sınıfı: Metallo-enzimdir (ZN içerir). Karbapenemlere etkilidir.

C Sınıfı: Kromozom kontrolünde sefalosporinaz,

D Sınıfı: Oksasilinazlar'ı içerir.

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

Bush ve arkadaşları, β -laktamazları substrat profilleri ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temeline göre 4 grupta toplamışlardır. Ancak bu grupların içerisinde bazı alt gruplar da yer almaktadır (Tablo 1) (17).

Tablo 1. Beta-laktamaz sınıfları

Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması	Temel Gruplar	Ambler sınıflaması	Temel özellikler/örnek enzimler
Grup 1 sefalosporinazlar		C (sefalosporinazlar)	Genellikle kromozomal (plazmit kökenli olanlar da vardır) karbapenemler hariç tüm beta-laktamlara dirençli; klavulanik asit ile inhibe olmaz. Gram-negatiflerin kromozomal beta-laktamazları ile plazmid kökenli CMY-2-CMY-13; LAT-1, MOX-1 ve MOX-2, FOX-1-FOX-6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 ve DHA-2, ACC-1, CFE-1
Grup 2 penisilinazlar (klavulanik asit ile inhibe olurlar)	2a	A (serin beta-laktamazlar)	Stafilokok penisilinazları
	2b	A	Geniş spektrumlu enzimler (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	A	Genişletilmiş spektrumlu (TEM, SHV türevi enzimler, PER-1, PER-2, CTX-M 1-30, VEB-1, GES-1, IBC-1e)
	2br	A	İnhibitör dirençli TEM (IRT): TEM-30-TEM-41,44,45,51,54 İnhibitör dirençli GSBL: TEM-50,-68,-80
	2c	A	Karbenisilini hidrolize eden enzimler
	2e	A	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar
	2f	A	Klavulanik asit ile inhibe olan karbapenemazlar: NMC-A, SME-1-SME-3, IMI-1, KPC-1-KPC-3, GES-2, SHV-38
	2d	D	Oksasilin hidrolize eden enzimler: Dar spektrumlu OXA tipi enzimler GSBL niteliğindeki oksasilinazlar: OXA-2 ve -10 türevleri, OXA-18, OXA-29-OXA-32, OXA-45 Karbapenem hidrolize edenler: OXA-23-OXA-27, -40, -48, -54
Grup 3 metallo-beta-laktamazlar	3a	B (metalloenzimler)	Çinko-bağımlı karbapenemazlar
	3b	B	Bc II, CCr A, L1
	3c	B	Cph A/Imı S FEZ-1 Plazmid kökenliler: IMP-1-17, VIM-1-VIM-7, GIM-1, SPM-1
Grup 4		Sınıflanmamış	Dizileri bilinmeyen çeşitli enzimler; özellikle <i>B.cepacia</i> 'da bulunan penisilinazlar

(Tablo: Prof. Dr. Zeynep GÜLAY, D.E.Ü. Mikrobiyoloji A.D. *Beta-laktamlara Direnç Mekanizmaları*, Sf: 13-15)

2.2.2. GSBL Tipleri

GSBL'lerin çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almışlardır. Günümüzde TEM türü beta laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta-laktamazlarınki 50'yi geçmiştir (18). Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan (CTX-M, PER, VEB vs.) genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olmuştur (19-23).

2.2.2.1 TEM'den Köken Alan GSBL'ler

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir (2,24). GSBL fenotipi TEM enziminde, belirli pozisyonlarda oluşan aminoasit değişiklikleri ile meydana gelmektedir. TEM grubu beta-laktamazlar *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. Nadir de olsa *P. aeruginosa*'da da bildirilmiştir (2,25). TEM-1 gram-negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimlerdir; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Ancak oksiminosefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. Buna karşın TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 *P. aeruginosa*'da, TEM-17 *Capnocytophaga ochracea*'da bildirilmiştir (26).

Öte Yandan, 1997 yılından itibaren bazı amoksisilin-klavulanik asite dirençli *E. coli*'lerin nükleotid dizilerinin incelenmesi ile TEM beta-laktamazlarındaki mutasyonlar sonucu, beta laktamaz inhibitörlerine dirençli yeni varyantların oluştuğu belirlenmiştir. Bu enzimler IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV'de sıralamaya girmiştir.

2.2.2.2. IRT

En sık olarak *E. coli*'de bulunan IRT'ler, bunun yanında *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir. IRT'ler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir. Klavulanik asit ve sulbaktam ve bunların klinik kullanımda olan kombinasyonlarına dirençli, tazobaktam ve piperasilin-tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdır.

2.2.2.3. SHV'den Köken Alan GSBL'ler

SHV grubu enzimlerin köken aldığı SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'da bulunmaktadır ve sıklıkla kromozomal bir enzimdir. TEM grubu GSBL'lere kıyasla SHV 'den köken alan enzimlerin sayısı daha düşüktür, ayrıca aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda karakteristik değişiklik, 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir (27). *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır; oksiiiminocefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (25). SHV-5 Yunanistan'da yaygındır. Ülkemizde *K. pneumoniae* izolatlarında SHV-5 ve SHV-12 bildirilmiştir (2).

2.2.2.4. OXA'dan Köken Alan GSBL'ler

OXA grubu enzimler daha çok *P. aeruginosa*'da bulunan GSBL'lerdir. OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir ve substrat oksasilin ve kloksasilindir (2,25,29). Aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiiminocefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (29,30). TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-cefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (29,30). OXA-11,14,15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 seftotaksime direnç oluşturmaktadır (2). OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (31). OXA-24 ayrıca karbapenemaz aktivitesi göstermektedir, fakat bu GSBL değildir. Bu enzim genlerinin çoğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir.

2.2.2.5. CTX-M

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni katılan bir gruptur. Substrat olarak seftotaksimi tercih etmektedir (2,25). Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak miktarda değildir. Büyük olasılıkla *Klyuvera ascorbata*'nın kromozomal AmpC beta-laktamazından köken almıştır. Sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri aminoasit değişiklikleri sonucu değil, büyük olasılıkla enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki yapısal değişiklikler sonucudur (2,25,27).

Bu enzimlerin önemli diğ er bir özelliğ i de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır. İlk CTX-M beta-laktamaz 1989 yılında Almanya'dan *E. coli*'de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır (31,33). Özellikle 1995 yılından itibaren büyük bir artış göstermiştir (34,35). Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır ve bunlar aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre beş gruba ayrılmıştır (32).

Tablo 2. CTX-M enzimleri ve alt grupları (33).

Grup	Enzimler
CTX-M 1	CTX-M 1, CTX-M 3, CTX-M 10, CTX-M 12, CTX-M 15, CTX-M 22, CTX-M 23, CTX-M 28, CTX-M 29, CTX-M 32, CTX-M 33, CTX-M 42, CTX-M 52, CTX-M 53, CTX-M 54, CTX-M 55 ve CTX-M 58
CTX-M 2	CTX-M 2, CTX-M 4, CTX-M 4L, CTX-M 5, CTX-M 6, CTX-M 7, CTX-M 20, CTX-M 35, CTX-M 43, Toho-1
CTX-M 8	CTX-M 8
CTX-M 9	CTX-M 9, CTX-M 13, CTX-M 14, CTX-M 16, CTX-M 17, CTX-M 19, CTX-M 21, CTX-M 27, Toho-2 ve iki yeni enzim CTX-M 24 ve CTX-M (JP0074)
CTX-M 25	CTX-M 25, CTX-M 26, CTX-M 41

CTX-M-14, CTX-M-3 ve CTX-M-2 en yaygın olan enzimlerdir. Yayılmaları hem plazmidlere hem de hareketli genetik elementlere (ISEcp1 gibi) bağlıdır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki enfeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (32).

Son yıllarda GSBL epidemisinde görülen eğ ilim, SHV tipi GSBL'lerin daha az görülürken, CTX-M tipi beta-laktamazların ön plana çıkması şeklindedir. CTX-M tipleri coğrafyaya bağlı olarak değ işmekle beraber elde olan veriler Türkiye'de Grup-1 enzimlerin, bunların arasından da CTXM 15 tipi enzimlerin yaygın olduğunu düşündürmektedir (78). Taşlı ve Bahar (79) dışkıdan elde ettikleri 63 GSBL üreticisi kökenin %52,7'sinde blaTEM, %74,3'ünde blaSHV geni saptamışlardır fakat bu

çalışmada araştırcılar CTX-M tipi enzimleri araştırmamışlardır. Ayrıca bu çalışma, CTX-M tipi enzimlerin tüm dünyada daha az yaygın olduğu dönemde yapılmıştır.

2.2.2.6. PER-1

TEM, SHV veya OXA beta laktamlardan köken almamış enzimlerdir. Önce kromozomal bir enzim olarak tanımlanan PER-1, Hacettepe Üniversitesi'nde 14 *P. aeruginosa* suşunda belirlenmiş ve plazmid kontrolünde bir enzim olduğu gösterilmiştir (37). PER-1 enzimi içeren *P. aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidime çok dirençli olmalarına karşın piperasilin için daha düşük bir direnç göstermeleridir. Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır.

2.2.3. GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı

GSBL üreten bir mikroorganizma ile infekte olan hastalarda geniş spektrumlu bir beta-laktam ile tedavi risklidir, GSBL ürettiği belirlenen bir bakteri, antibiyotik duyarlılık test sonucu ne olursa olsun, tüm geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmelidir. GSBL içerdii saptanan bakteriler, sefamisinler dışında tüm sefalosporinlere dirençli olarak rapor edilmelidir. Ayrıca, Amerika'nın klinik laboratuvarlar için Standartları Belirleme Komitesi [Clinical laboratory Standart Institute (CLSI)] önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır.

Bir örnekte, GSBL varlığını tespit etmek için şu yöntemler kullanılabilir:

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

- Moleküler teknikler (PCR, DNA probları, Nükleotid sekanslama)

2.2.3.1. Kombine Disk Yöntemi

Kombine disk yönteminde Sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerine 10 µg klavulonik asit eklenir. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen seftotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C’de inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir. Kombinasyon diski olarak 1 mg klavulonik asit içeren seftodoksım (10 µg) diskleri de kullanılabilir (38).

2.2.3.2. Çift Diskli Sinerji Testi

Disk difüzyon yöntemine dayanır. McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar plağına yayılır. Merkeze amoksisilin-klavulonik asit diski (AMC 10+20µg) yerleştirilir. Merkezden merkeze uzaklığı 20–25 mm olacak şekilde aztreonam (AZT 30µg), seftazidim (CAZ 30µg), seftotaksim (CTX 30µg) diskleri konulur. 35°C’de 18–20 saat inkübe edilir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik aside doğru genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasında bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bölge görülmesi GSBL pozitif(+) olarak yorumlanır (Resim 1) (38).



Resim 1. Çift disk sinerji yöntemi. (GSBL üreten suşlarda amoksisilin/klavulonik asit diskinin etrafına (20-30 mm) yerleştirilen seftazidim, seftopim, seftoksitin, aztreonam inhibisyon zon çaplarının genişlemesi (GSBL enziminin klavulonik asit varlığında inhibe olmasıyla b-laktam antibiyotiğın aktivitesinin artması).

Ancak, bu yöntem kullanılırken, dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Öncelikle Enzim substrat profili değişik olduğu için antibiyogramlarda indikatör antibiyotiklerin hemen hepsinin yer alması önerilmektedir. Amerika'nın Klinik laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerilerine göre; CAZ zon çapı 22 mm ve altındaysa, AZT ve CTX zon çapı 27 mm ve altındaysa, CRO zon çapı 25 mm ve altındaysa, CPD zon çapı 17 mm ve altındaysa; kesinlikle GSBL için doğrulama testi yapılmalıdır.

Tablo 3. GSBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon zonu ve MİK değerleri

Antibiyotik	İnhibisyon zonu(mm)	MİK (mg/L)
Sefotaksim	≤ 27	≥ 2
Seftriakson	≤ 25	≥ 2
Seftazidim	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksim	≤ 17	≥ 8
Aztreonam	≤ 27	≥ 2

2.2.3.3. Üç Boyutlu Test

Direkt veya indirekt uygulanabilir. Hazırlanan 0,5 Mc Farland bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar yüzeyine sürülür. Petrinin ortasına yakın tarafta ve kullanılan antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire şeklinde kesilir. Oluşan besiyeri çizgisine üç boyutlu test için hazırlanan yoğun inokulumdan 200µl konulur. Her iki inokulasyon yapıldıktan sonra seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam diskleri yerleştirilir. Bu disklere ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma, kesintiye uğrama veya bakterinin inokule edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi; antibiyotiğin yoğun inokulasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini gösterir ve GSBL pozitif olarak değerlendirilir (38).

2.2.3.4. Dilüsyon Yöntemleri

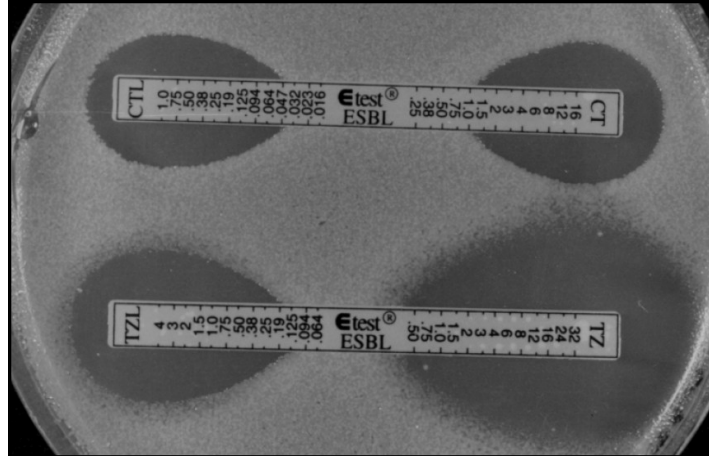
Mikrodilüsyon testinde 4mg/L klavulanik asit eklenmesiyle, GSBL üreten ajanların MİK değerinde 8 kat ve üzeri azalma saptanırsa, GSBL pozitifliğinden bahsedilmelidir.

2.2.3.5. Klavulanik Asit Kombinasyonlu Disk Difüzyon Testleri

Üzerine klavulanik asit (10 µg) damlatılan (veya ticari olarak kombinasyon halinde hazırlanmış) geniş spektrumlu beta-laktam disklerinin zon çaplarında ≥ 5 mm genişleme saptanması halinde, GSBL pozitifdir.

2.2.3.6. E Test Yöntemi

Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulonik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde seftaksim ve seftaksim-klavulonik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulonik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (Resim 2).



Resim 2. E test ile GSBL tayini. (Sol) GSBL üretmeyen bir suş. (Sağ) GSBL üreten bir suşun seftazidim MIC >256 µg/mL iken, seftazidim/klavulonik asit MIC değerinin ≥ 8 kat azaldığı görülmektedir.

2.2.3.7. Otomatize Sistemler

Otomatize tanısal sistemler, mikroorganizmaların zaman ve işgücü kaybı yaşanmadan, standardize bir dizi protokol uygulandıktan sonra, bazı firmalar (Becton Dickinson Diagnostics-USA, Dade Behring Inc-USA, bioMérieux-France... gibi) tarafından üretilen medikal cihazlar ile bazı spektrofotometrik ve/veya başka bir dizi ölçüm yöntemi kullanılarak tiplendirilmesini ve bazı sistemlerde, tek bir işlemde tiplendirilmenin yanı sıra ilaç dirençlilik profillerini de görüntülemek için kullanılan sistemlerdir.

Genel olarak, tiplendirilmek istenen mikroorganizmanın kolonilerinden elde edilen, belirli bir bulanıklıktaki (genellikle 0,5 Mc Farland) bakteri süspansiyonu, sistem ile birlikte sağlanan kartuşlar üzerindeki belirli bölgelere uygulanmaktadır. Daha sonra belirli bir ısıdaki inkübasyonun ardından, cihaz üzerine yerleştirilen kartuşların okunması ve sonuçların alınması ile tiplendirilme yapılmaktadır.

2.2.3.8. Moleküler Yöntemler

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya imkânsız olan enfeksiyöz ajanların tanımlanmasında halen en değerlisi olarak kabul edilmektedir. Benzer şekilde modern seroloji, akım sitometrisi ve elektron mikroskopi ve kütle spektrometri gibi güçlü araçlar ile birleştirildiğinde moleküler teknikler medikal uygulamada sık karşılaşılan patojenlerle birlikte, birçok yeni ortaya çıkan veya tekrar ortaya çıkan patojenlerin de hızlı (aynı gün) ve doğru olarak belirlenmesini olanaklı kılmaktadır (39). Enfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır ve mikroorganizma ve klinik materyalden nükleik asitin izole edilmesi gerekir ve sınırlayıcı endonükleaz enziminin, jel elektroforez ve nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin kullanımına dayanır. Giderek artan sayıda yeni nükleik asit amplifikasyon tekniği klinik materyallere uygulanmaktadır (40).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RCR) ile birlikte; nükleik asit amplifikasyonu ve amplifiye edilmiş ürünün floresan saptanması şeklinde kapalı sistemli yeni platformlar giderek artan spektrumlu enfeksiyöz hastalıkların esnek, hızlı ve doğru şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (41).

DNA sekans analizi; yüksek oranda otomatize olmuştur ve kültürde üretilebilen ve üretilemeyen çok sayıda mikroorganizmanın tanımlanması için referans ve tanı laboratuvarlarında kullanılabilir (42,43).

Moleküler dizi teknolojisinin geliştirilmesi ile mikroorganizmaların tanımlanmasındaki anlamlı potansiyel ortaya çıkmaktadır (44).

Moleküler tekniklerin daha geniş bir alanda kullanılmasındaki konulardan biri maliyettir (45). Enfeksiyöz hastalıkların tanısı alanında, hasta sonuçlarının iyileşmesi ve antimikrobiyallerin maliyetinin ve hastanede kalış süresinin azalması laboratuvar maliyetlerinin artmasına yeğlenebilir bir durumdur. Rakamlarla belirtmek zor olsa da, moleküler yöntemlerin tanısal uygulamalarının etkilerinin pozitif ve etkin maliyetli olduğunu gösteren örnekler mevcuttur (46).

Moleküler tanısal yöntemler, açıkça daha pratik ve maliyet-etkin hale gelmektedir ve hastalara faydası daha iyi anlaşılmaktadır. Ancak bu, hala eğitimli personel gerektiren ve ülkemiz için nispeten pahalı bir teknolojidir (47).

2.2.4. Dünyada GSBL'ler

Beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklere karşı bakteri direncinin en sık rastlanan nedenidir (48). Beta-laktamaz üretiminden sorumlu genler kromozomlar, transpozonlar ve plazmidlerde yerleşik olabilir, ancak plazmidlerde yerleşik genetik bilgi en büyük tehdidi oluşturmaktadır. Plazmidlerin dirençli genlerinin konjugasyonla organizmalar arasında kolayca aktarılmaları, direnç genlerinin birçok farklı türe hızla aktarılabilmesi anlamına gelmektedir, böylece beta-laktamazlara bağlı direncin patojen suşlar arasında yayılımı kolaylaşmaktadır (48).

Ancak, bu sorunun gerçek boyutları ne yazık ki ancak son 20 yıl içerisinde anlaşılmaya başlamıştır. Bugün tanımlanan beta-laktamazların toplam sayısı, 1990'larda bilinen sayının yaklaşık 3,5-4 katına ulaşmış durumdadır. O zamanlardan bu yana, birçok yeni beta-laktamaz ortaya çıkmıştır. Gram negatif basillerin seftazidim ve seftriakson gibi 3. kuşak sefalosporinlere duyarlılığındaki azalma, beta-laktamaz direncinin nasıl hızlı ortaya çıktığı ve yayıldığı konusunda iyi bir örnek oluşturmaktadır. Bu antibiyotikler, 1980'lerin başlarında piyasaya sunulmuş ve 1982'de ilk geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) tanımlanmıştır (5). Bundan sonra, GSBL'lerin prevalansı damatik bir artış göstermiştir. Örneğin, Fransa'da

Klebsiella pneumoniae'deki GSBL'lerin sıklığı 1985'teki %1 kadar düşük bir orandan 1988'de yaklaşık %15'e çıkmıştır. Farklı bölgelerde bulunan 12 Fransız hastanesinde yapılan araştırmada *Enterobacteriaceae*'lerdeki GSBL'lerin sıklığı %0 ile %46 aramda değişmekteydi (49). Günümüzde, GSBL'ler dünya çapında sıklıkla bulunmaktadır.

Beta-laktamaz direncinin yayılmasıyla etkin bir şekilde savaşmak için, şu an sahip olduğumuzdan daha çok ve iyi bilgilere gereksinim duyulmaktadır. Bir organizmanın beta-laktam antibiyotiğe karşı dirençli olup olmadığını basitçe saptayan çalışmalar, bahsedilen tüm bilgi gereksinimini karşılayamamaktadır. İlk olarak, direncin beta-laktamaz üretimine mi, yoksa başka bir mekanizmaya mı bağlı olduğu anlaşılmalıdır. İkinci olarak, dirençten hangi beta-laktamaz tipinin sorumlu olduğu bulunmalıdır. Birçok farklı beta-laktamaz, çeşitli beta-laktam antibiyotiklere benzer direnci geçirebilir. Beta-laktamaz dirençli organizmalarla bir araştırma yürütülürken, dünya çapındaki çeşitliliklerinden ötürü dirençten sorumlu spesifik enzimlerin belirlenmesi önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç ve Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

Kanlı agar (jeloz); genel kullanım besiyeri olarak kullanılan besleyici bir besiyeridir. 40 gram toz agar dH₂O içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak eritilmiş, pH'ı 7,3' e sabitlenmiş ve tamamen çözülme sağlanıncaya kadar kaynatılıp, otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra, hazırlanılan erimiş besiyeri 42°C'ye soğutulmuş ve üzerine 50 mL defibrine koyun kanı eklenip karıştırılarak, homojenizasyon sağlandıktan sonra steril plaklara dökülmüştür. Besiyerleri, kullanılmadan önce üreme kontrolleri yapılmıştır.

Mueller-hinton agar (MHA); örneklerin antibiyotik duyarlılık testleri sırasında kullanılmıştır. Ticari olarak sağlanan toz agar, üreticinin önerileri doğrultusunda ve oranlarda dH₂O içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak eritilmiş, pH'ı 7,3' e sabitlenmiş ve tamamen çözülme sağlanıncaya kadar kaynatılıp, otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra, hazırlanılan erimiş besiyeri 42°C'ye soğutulmuş ve steril plaklara dökülmüştür. Besiyerleri, kullanılmadan önce üreme kontrolleri yapılmıştır.

QUICOLOR ES[®] (SALUBRIS Inc. - U.S.A.) enterik bakteriler ve stafilokoklar için üretilen hızlı antibakteriyel duyarlılık test besiyerleri, hazır olarak, ticari bir şekilde 10'arlı plaklar olarak temin edilmiş ve kontrolleri yapıldıktan sonra kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Antibiyotikler

Aztreonam ATM (30µg), amoksisilin-klavulonik asit AMC (30µg), seftazidim CAZ (30µg), seftriakson CRO (30µg), sefotaksim CTX (30µg), sefepim FEP (30µg), sefoksitin FOX (30µg) ve Imipenem IPM (10µg) diskleri (Oxoid, England) ticari olarak temin edilip, kullanılmıştır.

3.1.3. PCR İşlemleri için Kullanılan Cihazlar

Eppendorf MasterCycler gradient, 96 örnek kapasiteli termal döngüleme cihazı

TECHNE TC-312, 25 örnek kapasiteli termal döngüleme cihazı.

3.1.4. Elektroforez İçin Kullanılan Gereçler

4 µl 6X Loading Dye solution, 2 µl PCR ürünü (DNA), 10 µl DNA ladder, 2 gr. agaroz, sırasıyla agaroz jel ve elektroforez tankında yürütme yapmak için; 100 ml. ve 500 ml. TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) buffer.

3.1.5. Kullanılan Diğer Gereçler

Steril eküvyon, bek alevi, iğne öze, tek kullanımlık plastik steril öze, gram boyama seti (kristal viyole, lügol, denatüre alkol, sulandırılmış fuksin), hassas terazi, etüv, mikroskop, 2 ve 0,2 ml.'lik steril tek kullanımlık kapaklı ependorf tüpleri, pipet ve pipet uçları, soğutucu, dondurucu, steril pudrasız tek kullanımlık eldiven.

3.2. Yöntemler

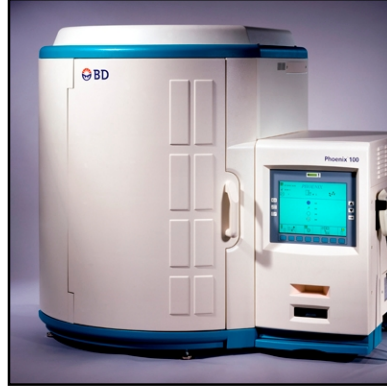
3.2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya Ocak 2005 - Ağustos 2007 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi kliniklerinde yatan hastalardan alınan GSBL pozitif toplam 100 adet nozokomiyal örnek dâhil edilmiştir.

Sözü edilen örneklerin, identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılıkları tayini (antibiyoqramları), Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Bakterioloji departmanında, örneklerin uygun besiyeri içeren plaklara ekilip, 18-24 saat 37°C'deki inkübasyonlarının ardından geleneksel yöntemler ile yapılmıştır. Daha sonra, araştırma konusuna uygun olarak görülen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* suşları, Phoenix[®] (BD) sistemi ile doğrulanmıştır.

3.2.2. Phoenix[®] (Becton Dickinson Diagnostics) Sistemi ile Doğrulama

Geleneksel laboratuvar yöntemleri ile identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılıkları saptanan ve pozitif olarak kategorilendirilen örnekler, bir otomatize identifikasyon sistemi olan Phoenix[®] (BD Diagnostics-USA) sistemi ile doğrulama işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmanın bu aşamasında, geleneksel yöntemler için kullanılan plaklar kullanılmıştır. Üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, plaklardan alınan yeterli miktardaki koloniler AST Broth solüsyon tüpünün içerisinde CrystalSpec nephelometer (BD Diagnostics) cihazı kullanılarak son bulanıklığı 0,5 Mc Farland standardı yoğunluğunda olacak şekilde süspanse edilmiştir.



Resim 3. Phoenix[®] (Bekton Dickinson Diagnostics) Sistemi

Ardından, standardize ID Broth solüsyonundan 25 µl. pipet yardımıyla, önceden hazırlanan AST Broth solüsyon tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra, elde edilen solüsyonlar NMIC/ID-108 combo paneller içerisindeki uygun kuyucuklara inoküle edilmiş ve Phoenix[®] cihazına dikkatlice yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda identifikasyon ve antibiyogramları tamamlanan örneklerin değerlendirilmesi BD EpiCenter™ yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın ardından diğer doğrulamalar ve çalışmalar yapıncaya kadar, sözü edilen örnekler laboratuvarın bakteri bankasında -80°C’de cam boncuklar içeren tüpçükler içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.2.3. MicroScan[®] (Dade Behring Inc.) Sistemi ile Doğrulama

Yapılacak olan çalışmanın amacına uygun olarak, Dade Behring firmasının MicroScan[®] isimli identifikasyon sistemi ile karşılaştırmalı doğrulama aşamasına geçilmiştir.

100 adet *Enterobacteriaceae* olduğu geleneksel yöntemler ile tespit edilen ve Phoenix sistemi ile test edilen örnekler, bu aşamadan bir gün önce bakteri bankasından alınarak, brain heart besiyeri içeren 2 ml.’lik ependorf tüpler içerisinde süspanse edilip, 37°C’de 24 saat bekletilerek canlandırılmıştır. Canlandırılan örnekler, bir sonraki gün kanlı agar içeren plaklara ekilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda olgunlaşan koloniler, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda bir dizi işleme tabi tutularak, MicroScan[®] sistemi ile doğrulanmıştır. Yapılan işlemler sırasıyla şu şekildedir: sistemin kendisine özgü patetntli Promt™ inokülasyon çubukları, kanlı agar yüzeylerine dik şekilde tutularak,

çubuk ucu ile aynı büyüklükte ya da daha büyük olan koloni yüzeylerine dokundurulmuştur. Çubukların üzerlerindeki aparatlar çekip çıkartılarak, fazla miktarda koloninin elimine edilmesi sağlanmıştır. Patentli Promt™ şişelerinin kapakları kırıldıktan sonra, hazırlanılan çubuklar şişeler içerisine yerleştirilmiştir. 30 mL'lik Pluronik-D sıvısı içeren şişeler iyice sallanarak, içlerinde birer bakteri süspansiyonu oluşturulmuştur. Süspansiyon daha sonra sistem ile birlikte ticari olarak sağlanan inokülatör-D isimli plastik transfer kabı içerisine boşaltılıp kapakları kapatılarak, MicroScan® panelleri inokülasyona hazır hale getirilmiştir. Daha sonra sistem ile birlikte sağlanan RENOK® Rehydrating Inoculator, transfer kapakları üzerine yerleştirilip sıvıları kapaktaki problara çekmek için RENOK®,un merkezindeki siyah bölme bastırılmıştır. Transfer kapakları RENOK® yardımı ile MicroScan® panelleri üzerlerine taşınarak yerleştirilmiş ve sıvıların paneller içerisindeki kuyucuklara eşit miktarlarda dağılması sağlanmıştır.



Resim 4. MicroScan® (Dade Behring Inc.) idenfikasyon cihazı

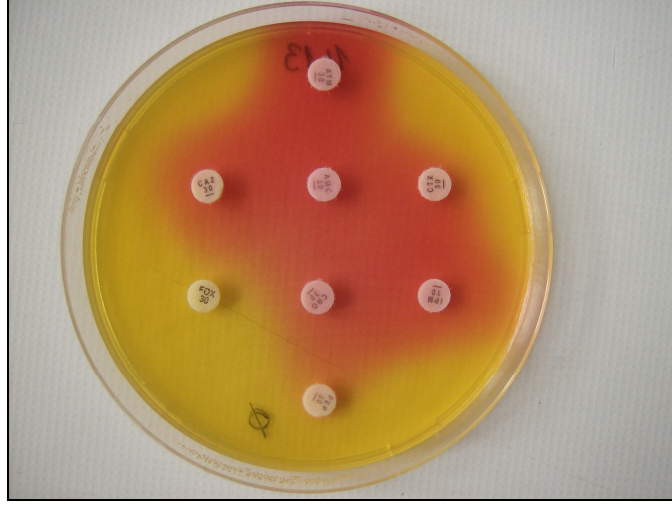
Ardından, cihaza kayıtları yapılan paneller 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından, cihazın okuyucu gözüne yerleştirilen paneller, LabPro™ Information Manager paket yazılımı yardımı ile değerlendirilmiştir.

3.2.4. QUICOLOR ES® (SALUBRIS Inc. - U.S.A.) Test Besiyeri ile Doğrulama

Daha önceden üç farklı yöntem ile identifiye edilen ve antibiyogramları yapılan örnekler, çalışmanın bu aşamasında, doğrulama ve karşılaştırma yapılması amacıyla, QUICOLOR ES® (SALUBRIS Inc.) enterik bakteriler ve stafilkoklar için üretilen hızlı antibakteriyel duyarlılık test besiyerleri ile bir kez daha duyarlılık testine tabi tutulmuştur.

Testin bu aşamasında, rutin kullanımda zaman tasarrufu sağlamayı hedefleyen QUICOLOR ES® üreticisinin ticari olarak satışa sunduğu renkli boya

indikatörleri ihtiva eden in vitro hızlı antibiyogram agarları kullanılmıştır. Üreticinin önerileri doğrultusunda örneklerin taze kültürlerinden hazırlanan bakteriyel süspansiyonlar, CrystalSpec nephelometer (BD Diagnostics) cihazı kullanılarak son bulanıklığı 0,5 Mc Farland standardı yoğunluğunda olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan süspansiyonlar, QUICOLOR ES[®] besiyerleri yüzeyine steril bir eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Ardından çalışmanın amacına uygun olarak seçilen ticari Aztreonam ATM (30µg), amoksisilin-klavulonik asit AMC (30µg), seftazidim CAZ (30µg), seftriakson CRO (30µg), sefotaksim CTX (30µg), sefepim FEP (30µg), sefoksitin FOX (30µg) ve Imipenem IPM (10µg) diskleri (Oxoid, England), aralarında merkezden merkeze 20'şer mm. uzaklık olacak şekilde steril bir pens yardımı ile yerleştirilmiş ve 37°C'de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 5. QUICOLOR ES[®] (SALUBRIS Ltd – Tr) test besiyeri ile doğrulama

İnkübasyonun ardından, besiyerinin üretim amacı doğrultusunda renk değişimlerinden üreme/inhibisyonlar göz ve cetvel yardımı ile incelenip değerlendirilmiştir.

3.2.5. Tüm CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması

Yapılan tüm identifikasyon ve antibiyogram doğrulamalarının ardından, bir sonraki aşamada örnekler moleküler yönden CTX-M genleri açısından değerlendirilmiştir.

3.2.5.1. Hücrelerin Parçalanması

Öncelikle; 100 adet endorf tüpü numaralandırılıp, her birinin içerisine 1000 µl (1 ml) Steril distile su (dH₂O) eklenmiştir. Daha önceden kanlı agarlara ekilip,

canlandırılan suşların kolonilerinden steril özeler yardımıyla koloniler alınıp, son bulanıklıkları 0,5 McFarland olacak şekilde ependorf tüplerinde süspansedilmiştir. Ardından ependorf tüpleri, 10.000 RPM'de 5'er dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonunda dipteki çöküntü (pellet) kısmına dokunulmadan, üstteki sıvı (supernatant) pipet yardımıyla çekilip, tüpten uzaklaştırılmıştır. Bir kez daha 50'şer µl dH₂O, ependorf tüplerinin üzerine eklenip vortekslenmiş ve ertesi güne kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Sonraki gün; soğutucudan alınan tüm ependorf tüpleri, 96°C'de 10'ar dakika bekletilip, hücrelerin parçalanması, dolayısı ile nükleik asitin ortaya çıkarılması sağlanmıştır. İşlemi biten tüpler, sipariş edilen primerlerin laboratuvara ulaşması beklenene kadar tekrar -20°C'de muhafaza edilmiştir (50 dk).

3.2.5.2. Primerlerin ve Master Mix'lerin Hazırlanması

Alman MetaBion firmasına sipariş edilen liyofilize durumdaki primerlerden 36,4 nanomol (nmol) olan CTXMA1 (5'-SCS-ATG-TGC-AGY-ACC-AGT-AA-3'), ve 39,5 nmol olan CTXMA2 (5'-CCG-CRA-TAT-GRT-TGG-TGG-TG-3') primerleri sırasıyla 364 µl ve 395 µl dH₂O eklenilerek, sulandırılmıştır. Sulandırılan primer tüpleri, ufak parmak darbeleriyle karıştırılmış, böylece çalışmanın amacına yönelik 100 pikomol (pmol)'lük primerler hazırlanmıştır. Ardından master mix hazırlanmasına geçilmiştir. Bunun için kullanılan malzemeler ve volümler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. Universal CTX-M master mix'in hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Vol.	1 Tüp için Gereken
Buffer (10X)	1X	300 µl	150 µl
MgCl ₂ (25mM)	2mM	240 µl	120 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	60 µl	30 µl
CTXMA1 (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl	6 µl
CTXMA2 (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl	6 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	18 µl	9 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamla	2358 µl	1179 µl
TOPLAM	-	3000 µl	1500 µl

Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 100 örnek olduğu için: 30 X 100 = 3000 µl olmalıdır. Ancak bir ependorf tüpü, en fazla 1500 µl alabildiği için; volümler 1500'er µl olarak, 2 defa hazırlanmıştır.

3.2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Bir sonraki basamakta; soğutucuda muhafaza edilmiş ve parçalanmış olan bakteri hücreleri çıkartılıp, 12.000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilmiş, ve mixlerle birlikte

çalışılacak olan steril kabine alınmıştır. Ardından 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi (1’den 100’e) kadar numaralandırılıp, içlerine 28’er µl hazırlanılan MasterMix’ten ilave edilmiştir. Daha sonra, santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımlarından 2’şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına (ilk 25 tanesi: TECHNE TC-312, sonraki 75 örnek ise; Eppendorf Master Cycler Gradient cihazına) yüklenip, programlanmıştır. Program basamakları aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir:

Tablo 5. PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	5 dk.
Denaturing	35	94°C	1 dk.
Annealing		50°C	1 dk.
Extension		72°C	1 dk.
Holding	1	72°C	5 dk.
Holding	1	4°C	∞ dk.

Termal döngüleme cihazlarında PCR işlemleri tamamlanan örnekler; elektroforez (yürütme) için laboratuvarın diğer bir bölümüne alınmıştır.

3.2.5.4. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Kullanılacak olan jeli hazırlamak için; hassas terazide 2 gr. Agaroz tartılıp, 500 ml. lik bir şişe içerisine konulmuştur. Ardından; bir dereceli silindir kaptan 100 ml. ölçülen TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek, karıştırılmış ve sonra mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk. kaynatılan karışım, çeşme suyu altında 40-50°C’ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dk. oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

3.2.5.5. Örneklerin Yüklenmesi

1/6’lık elektroforez boyasından (loading dye) pipetin ucuna 4 µl alınıp, daha sonra elde edilen PCR ürünleriyle karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

3.2.5.6. Yürütme (Elektroforez)

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 Volt (V)'luk akımda 30 dk. yürütülmüştür.

3.2.5.7. Görüntüleme

30 dk. lık elektroforez zamanının ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dk. boyanmaya yatırılmıştır. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki uygun odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirilmiştir.

3.2.6. Grup-1 CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması

Bir sonraki aşamada; elde edilen CTX-M pozitif örneğin gruplandırılması için, 65 pozitiflik saptanan örnek için ikinci bir PCR ve elektroforez çalışması daha yapılmıştır. Bu aşamada; Grup-1 CTX-M'lerin saptanması hedeflenmiş ve bunun için M13U (5'-GTT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3') ile M13L (5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3') primerleri kullanılarak yeni bir master mix hazırlandı. master mix'in içeriği aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Tablo 6. CTX-M 1 master mix'in hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Vol.	1 Tüp için Gereken
Buffer (10X)	1X	200 µl	100 µl
MgCl ₂ (25mM)	2mM	160 µl	80 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	40 µl	20 µl
M13U (100 pMol)	0,4 pMol	8 µl	4 µl
M13L (100 pMol)	0,4 pMol	8 µl	4 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	12 µl	6 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamla	1572 µl	786 µl
TOPLAM	-	2000 µl	1000 µl

Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 65 örnek olduğu için: $30 \times 65 = 1950 \approx 2000$ µl olmalıdır. Ancak bir ependorf tüpü, en fazla 1500 µl alabildiği için; volümler 1000'er µl olarak, 2 defa hazırlanmıştır.

PCR, jelinin hazırlanması, örneklerin yüklenmesi, yürütme ve görüntüleme işlemleri yukarıda anlatılan prosedüre göre uygulanmış ve değerlendirme sonucunda, elde edilen 65 adet CTX-M pozitif suştan 25 tanesinin pozitif bant verdikleri gözlemlenmiştir.

3.2.7. Grup-2 ve Grup-9 CTX-M Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Saptanması

Önceden yapılan PCR ve yürütme işlemlerinin sonucunda pozitif bulunan CTX-M kodlayan suşlar ve Grup-1 CTX-M kodlayanları ortaya çıkarılmıştır. Diğer aşamada, geriye kalan örneklerin hangi grup/gruplara ait olduğunu saptamak için, ikinci bir düzene kurulmuştur.

Bu PCR düzeneğinde, alınan örneklere aynı anda 2'şer primer konulmuştur. Bu aşamada; Grup-2 ve Grup-9 CTX-M'lerin saptanması hedeflenmiştir. Bunun için; sırasıyla M25U (5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3'), M25L (5'-TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC-3'), M9U (5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3') ve M9L (5'-CCC TTC GGC GAT GAT TCT C-3') primerleriyle aşağıdaki tablodaki oranlara uygun olarak, master mix'ler hazırlanmıştır.

Tablo 7. CTX-M 2 master mix'in hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Vol.
Buffer (10X)	1X	60 µl
MgCl ₂ (25mM)	2mM	48 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	12 µl
M25U (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
M25L (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	3,6 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	≈1080 µl
TOPLAM	-	1200 µl

Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 40 örnek olduğu için: 30 X 40 = 1200 µl olmalıdır. Ve bu kez, bir ependorf tüpü 1500 µl alabildiği için; volümler 1200 µl olarak, 1 defa hazırlanmıştır.

Tablo 8. CTX-M 9 master mix'in hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Vol.
Buffer (10X)	1X	60 µl
MgCl ₂ (25mM)	2mM	48 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	12 µl
M9U (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
M9L (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	3,6 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	≈1080 µl
TOPLAM	-	1200 µl

Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 40 örnek olduğu için: 30 X 40 = 1200 µl olmalıdır. Ve bu kez, bir ependorf tüpü 1500 µl alabildiği için; volümler 1200 µl olarak, 1 defa hazırlanmıştır.

PCR, jelinin hazırlanması, örneklerin yüklenmesi, yürütme ve görüntüleme işlemleri yukarıda anlatılan prosedüre göre uygulanmış ve değerlendirme sonucunda, geriye

kalan 40 adet CTX-M pozitif suştan 1 adet suş CTX-M Grup-2 pozitif ve 1 adet suş CTX-M Grup-9 pozitif olarak bantlanma göstermiştir.

3.2.8. Kalan Suşların Kontrol Edilmesi

Bu kez kurulan düzenekte; önceden elde edilen pozitifler ve sonradan tiplendirilen örneklerin ardından, geriye kalan örneklerin CTX-M yönünden tekrar test edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için; daha önceden numaraları alınan örneklerin plaklarından tekrar ekstraksiyon yapılmış ve bir kez daha PCR düzeneği kurulup, yürütmeleri yapılmıştır.

3.2.8.1. Hücrelerin Parçalanması

Ubukata lizis solüsyonu (10 ml için) hazırlamak için öncelikle; 1 ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 22,5µl IGEPAL CA-630 (Sigma), 22,5µl Tween 20 (Biorad), 220 µl Protease K (10mg/ml), 8.755 ml dH₂O'dan pipet yardımı ile ölçülerek, 2 ml'lik ependorf tüpünde karıştırılmıştır. 30'ar µl hazırlanan Ubukata solüsyonundan, 0,2 mL'lik ependorf tüplerine ilave edilmiş ve daha önceden numaraları alınan örneklerin plaklarından alınan 1'er adet koloni, bu solüsyonlar içerisinde süspansiyon edilerek, hazırlanmıştır. Daha sonra; hazırlanan 0,2 mL'lik ependorf tüpleri, 60°C'de 10 dk. ve daha sonra 95°C'de 5 dk. muamele edilerek, hücreler parçalanmıştır. Ardından, daha önceden yapılan PCR çalışmasında pozitif olarak gözlemlenen 1 adet örnek, pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.2.8.2. Primerlerin Hazırlanması

Daha önce Grup-1 CTX-M kodlayan örneklerin tespiti için kullanılan M13U (5'-GTT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3') ve M13L (5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3') primerleri kullanılarak yeni bir master mix hazırlanmıştır. Hazırlanan master mix'in içeriği aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Tablo 9. CTX-M 1 tekrar master mix'in hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Vol.
Buffer (10X)	1X	60 µl
MgCl ₂ (25mM)	2mM	48 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	12 µl
M13U (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
M13L (100 pMol)	0,4 pMol	2,4 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	3,6 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	≈1080 µl
TOPLAM	-	1200 µl

Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 40 örnek olduğu için: 30 X 40 = 1200 µl olmalıdır. Ve bu kez, bir ependorf tüpü 1500 µl alabildiği için; volümler 1200 µl olarak, 1 defa hazırlanmıştır.

PCR, jelin hazırlanması, örneklerin yüklenmesi, yürütme ve görüntüleme işlemleri yukarıda anlatılan prosedüre göre uygulanmıştır (1 adet marker + 38 adet örnek + 1 adet pozitif kontrol). Buna göre, alınan sonuçlarda yüklenen 38 örnekte de CTX-M Grup-1 yönünden pozitif olduklarını gösteren bantlar gözlemlenmiştir.

3.2.9. Amplikonların Sekanslamalarının Yapılması

Yapılan tüm örnek tiplendirilmesi, doğrulamalar, PCR işlemleri ve yürütmelerin ardından, elde edilen CTX-M pozitif örnekler, sekanslarının yapılması ve daha detaylı olarak tiplendirilmek üzere bir dış laboratuvarın yardımı ile sekansları yapılmak üzere işleme alınmıştır. Sekanslar, ABI prism 3700 DNA analyser, (Applied Biosystem, CA) cihazı ile yapılmıştır.

Alınan sekans sonuçları, nükleotid ve/veya peptid sekans sonuçlarında, baz çiftlerinin veya aminoasitlerin her birisi için hek harf kodu kullanılan FASTA formatına dönüştürülüp, web sayfası üzerinden online olarak tanımlama yapmaya olanak verebilen:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome web adresindeki uygun yere yazılıp, kontrolleri yapılmıştır (Ek 1-1, Ek 1-2 ve Ek 2).

4. BULGULAR

Afyonkarahisar bölgesinde en sık hastane enfeksiyonlarına yol açan *Enterobacteriaceae* grubunda GSBL varlığı ve bunlar içinde CTX M tipi direnç enzimlerinin varlığı ile alt türlerinin belirlenmesini amaçlayan bu çalışmaya, 45'i erkek, 55'i kadın olmak üzere toplam 100 olgu dâhil edilmiştir. Bununla birlikte, çalışma grubunda yer alan 100 olgunun ortalama yaşı $34 (\pm 2.3)$ olup, cinsiyetlere göre yaş ortalamaları ise sırasıyla $33.84 (\pm 1.8)$ erkek ve $34.63 (\pm 3.1)$ kadın olarak tespit edilmiştir.

Tablo 10. Olguların cinsiyetlerine göre ve yaşlarına göre dağılımları.

Cinsiyet	Yaş	Hasta	
		N	%
Erkek	33.84 (± 1.8)	45	45
Kadın	34.63 (± 3.1)	55	55
Ortalama/Toplam	34.00 (± 2.3)	100	100

Çalışmada ele alınan olguların 5'inin 0-5 yaş, 1'inin 6-10 yaş, 5'inin 11-15 yaş, 21'inin 16-25 yaş, 24'ünün 26-35 yaş, 20'sinin 36-45 yaş, 13'ünün 46-55 yaş, 10'unun 56-65 yaş ile 1'inin 65 ve üzeri yaşta olduğu saptanmıştır.

Tablo 11. Olguların yaş gruplarına göre dağılımları.

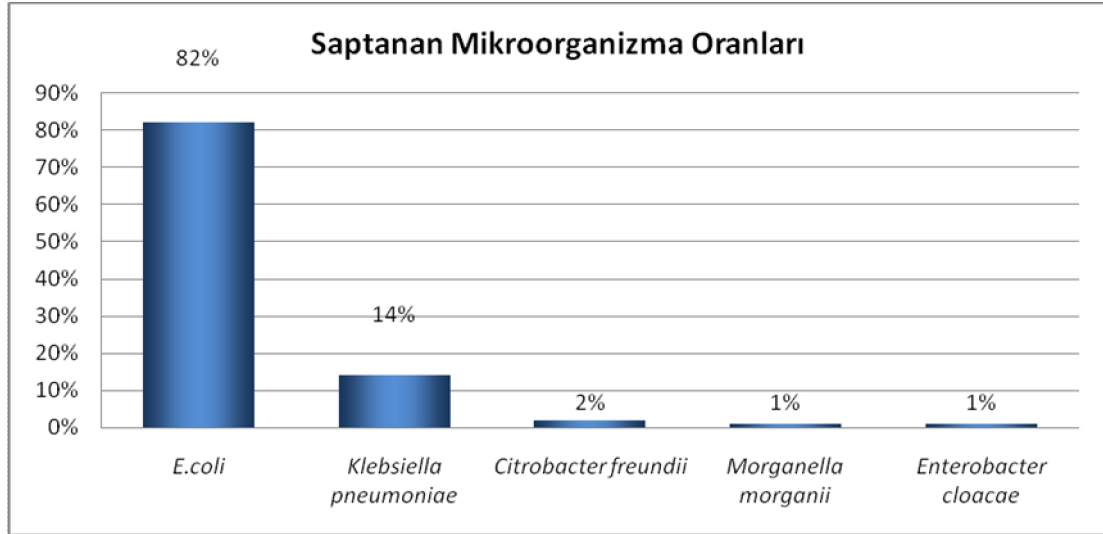
Yaş	Hasta	
	N	%
0-5	5	5
6-10	1	1
11-15	5	5
16-25	21	21
26-35	24	24

Yaş	Hasta	
	N	%
36-45	20	20
46-55	13	13
56-65	10	10
65 ve üzeri	1	1
Toplam	100	100

Çalışmada ele alınan 100 adet GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* suşunun etkenlere göre dağılımı ise; 82 *E. coli*, 14 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Citrobacter freundii*, 1 *Morganella morganii* ve 1 *Enterobacter cloacae* şeklinde tesbit edilmiştir.

Tablo 12. GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* suşlarının etkenlere göre dağılımları.

<i>Enterobacteriaceae</i> suşu	N	%
<i>E. coli</i>	82	82
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	14
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2
<i>Morganella morganii</i>	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
Toplam	100	100

Grafik 1. GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* suşlarının etkenlere göre dağılımları.

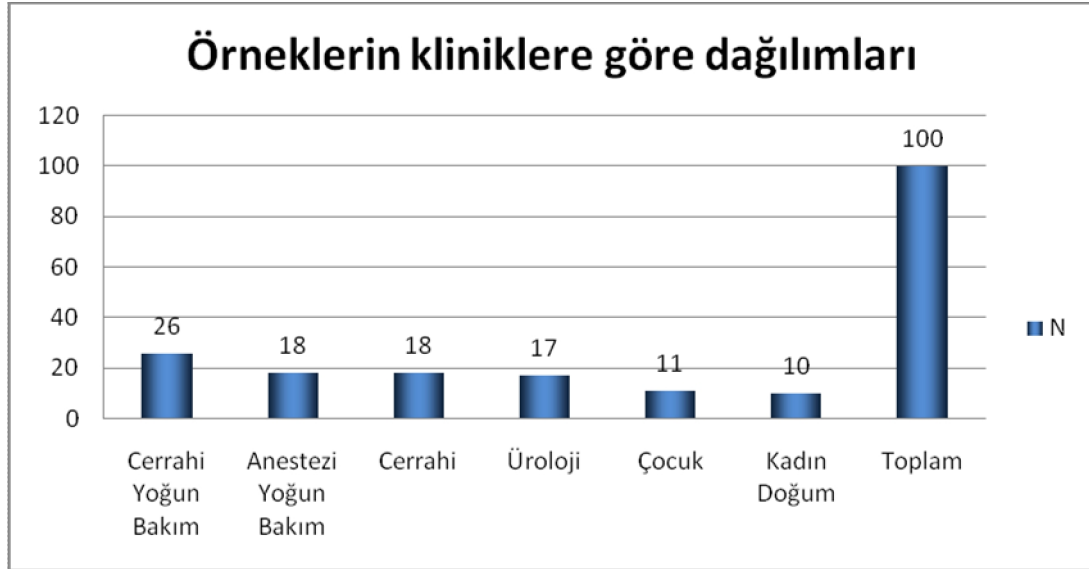
Çalışmada 4 farklı antibiyotik duyarlılık testi, ve ayrıca 3 farklı identifikasyon yöntemi kullanılıp, bu yöntemlerin birbirleri arasındaki uyumluluklarını da karşılaştırılma fırsatı bulunmuştur. Buna göre, geleneksel yöntemlerle yapılan identifikasyon ile bir otomatize sistem olan Phoenix® (BD Diagnostics-USA) ve yine bir otomatize sistem olan MicroScan® (Dade Behring Inc.) sistemleri karşılaştırıldığında, geleneksel yöntemlerle, Phoenix® sistemi ve geleneksel yöntemlerle MicroScan® sistemi ve Phoenix® sistemi ile MicroScan® sisteminin identifikasyon karşılaştırmalarında sırasıyla %98, %97 ve %96 uyumlu sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir.

Tablo 13. İdentifikasyon yöntemlerinin birbirleri ile uyumluluk karşılaştırmaları.

	Geleneksel Yöntem		Phoenix®		MicroScan®	
	Uyumlu	Uyumsuz	Uyumlu	Uyumsuz	Uyumlu	Uyumsuz
Geleneksel Yöntem	-	-	98	2	97	3
Phoenix®	98	2	-	-	96	4
MicroScan®	97	3	96	4	-	-
Toplam		100		100		100

Öte yandan, çalışmada kullanılan örneklerin alındığı nozokomiyal hastaların kabul edildiği veya gönderildiği kliniklere göre dağılımları gözden geçirildiğinde; sırasıyla Cerrahi Yoğun Bakım (%26), Anestezi Yoğun Bakım (%18), Cerrahi (%18), Üroloji (%17), Çocuk (%11) ve Kadın Doğum (%10) kliniklerinin çalışmaya dahil edildiği gözlemlenmektedir (Grafik 2).

Grafik 2. İncelenen örneklerin kliniklere göre dağılımları.



Bunun yanında, çalışmada incelenen mikroorganizmaların izole edildiği örnek tiplerinin dağılımına bakıldığında, en çok idrar (46,%46), yara yeri (21,%21), balgam (16,%16) ve kan (14,%14) ön plana çıkmaktadır.

Tablo 14. İncelenen örneklerin tiplerine göre dağılımları.

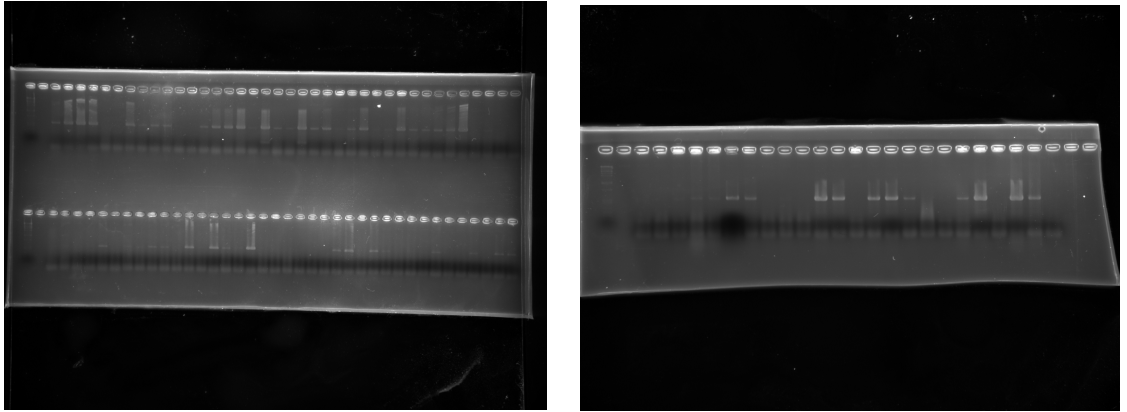
Örnek Tipi	N	%
İdrar	46	46
Yara Yeri	21	21
Balgam	16	16
Kan	16	16
Diğer	1	1
Toplam	100	100

Bununla birlikte, çalışmamızda tiplendirilen suşlara göre, aldığımız antibiyotik duyarlılıkları da Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 15. Suşlara göre % antibiyotik duyarlılık sonuçları

<i>Enterobacteriaceae</i> suşu	TZP	IPM	CN	TOB	SXT	CİP	
<i>E. coli</i>	82	%76	%100	%95	%4	%22	%14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	%73	%100	%82	%18	%27	%64
<i>Citrobacter freundii</i>	2	%50	%100	%50	%0	%50	%50
<i>Morganella morganii</i>	1	%100	%100	%100	%100	%0	%100
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	%100	%100	%100	%100	%0	%100

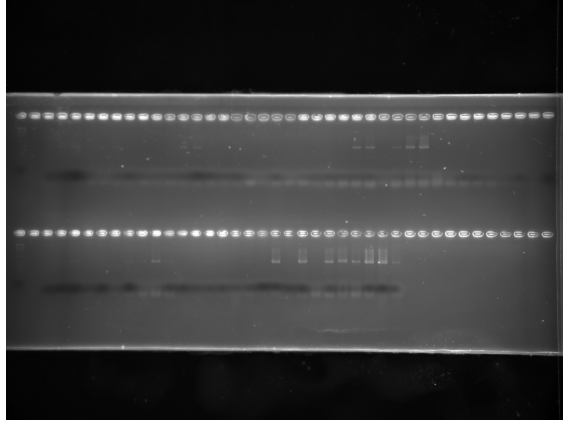
Yapılan çalışmanın ikinci bölümü olan moleküler tanı kısmında ise, ilk aşamada test edilen 100 GSBL pozitif suşun, CTXMA1 (5'-SCS-ATG-TGC-AGY-ACC-AGT-AA-3'), ve CTXMA2 (5'-CCG-CRA-TAT-GRT-TGG-TGG-TG-3') universal primerleri ile yapılan genel CTX-M pozitifliğinin PCR yöntemi ile saptanmasında, 65 adet örnek pozitif olarak bulunmuştur.



Resim 6. 100 GSBL pozitif suşun universal primerler ile CTX-M PCR pozitifliği saptanması.

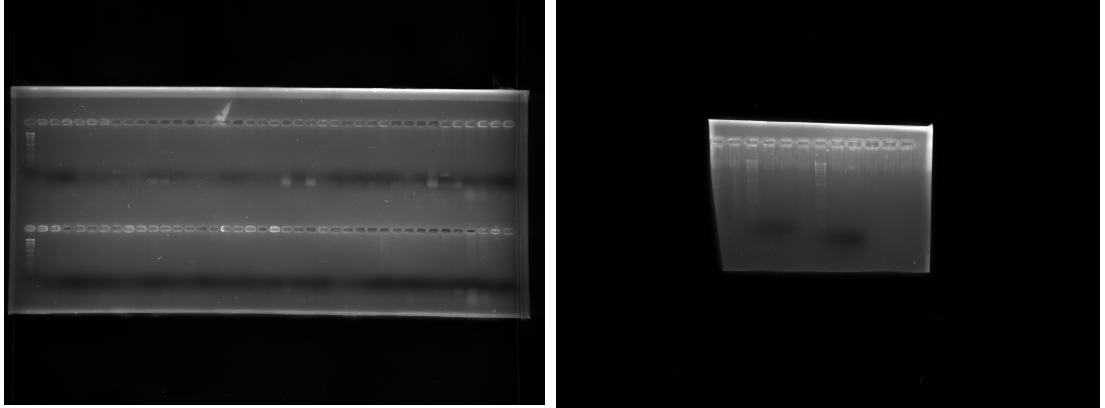
Bir sonraki aşamada; elde edilen 65 CTX-M pozitif örneğin gruplandırılması için yapılan ikinci PCR yürütmesinde Grup-1 CTX-M'lerin saptanması hedeflenmiş ve bunun için M13U (5'-GTT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3') ve M13L (5'-TTG

GTG ACG ATT TTA GCC GC-3') primerleri kullanılmıştır. Bu PCR yürütmesinde ise elde edilen 65 adet suşun 25 tanesinin pozitif bantlanma verdikleri gözlemlenmiştir.



Resim 7. 65 CTX-M pozitif suşun Grup-1 CTX-M primerleri ile CTX-M 1 PCR pozitifliği saptanması.

Böylelikle, yapılan iki adet PCR yürütmesinde, 65 adet pozitif CTX-M suşun 25 tanesinin CTX-M Grup-1 olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan 40 adet suşun hangi grup/gruplara ait olduğunu öğrenmek için, Grup-2 ve Grup-9 CTX-M'lerin saptanması hedeflenmiştir. Bunun için; sırasıyla M25U (5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3'), M25L (5'-TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC-3'), M9U (5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3') ve M9L (5'-CCC TTC GGC GAT GAT TCT C-3') primerleriyle bir diğer multiplex PCR düzeneği kurulmuştur.



Resim 8. 40 CTX-M pozitif suşun Grup-2 ve Grup-9 CTX-M primerleri ile CTX-M 2 ve CTX-M 9 PCR pozitifliği saptanması.

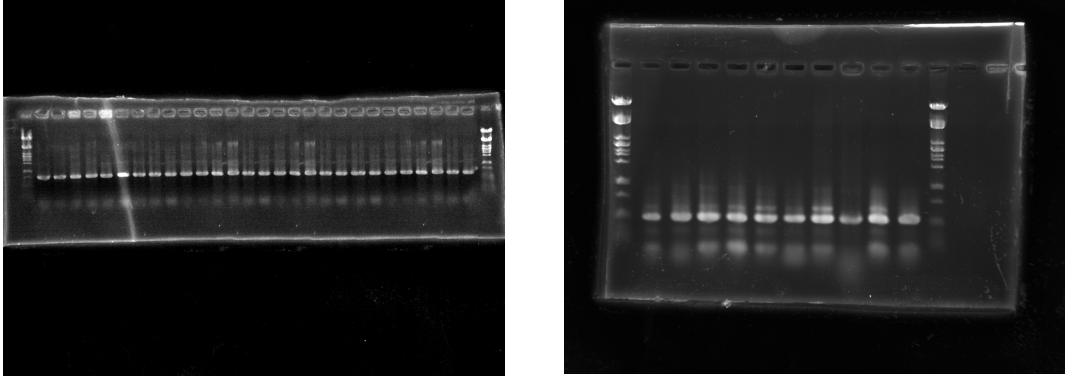
Yapılan PCR ve yürütmenin ardından, yüklenen 40 örnekten 2 tanesinin Pozitif bantlanma verdikleri gözlemlenmiştir. Kullanılan M25U ve M25L primerleri, tüm CTX-M Grup-2 alttürleri için kullanılan primerler olup, 1 adet CTX-M Grup-2

pozitif ve yine kullanılan M9U ve M9L primerleri, tüm CTX-M Grup-9 alttürleri için kullanılan primerler olup, 1 adet CTX-M Grup-9 suş, pozitif olarak tespit edilmiştir.

Yapılan son deneyde saptanan 2 adet pozitif sonucun ardından, bir önceki PCR çalışmasından kalan 38 adet pozitiflik saptanan örneklerin, tekrar kontrol edilmesi gerekliliği doğmuştur.

Bu kez kurulan düzende; önceden çıkan 65 adet pozitiflik ve sonradan tiplendirilen 27 adet örneğin ardından, kalan 38 örneğin tekrar test edilmesi hedeflenmiştir.

Bunun için; daha önceden numaraları alınan örneklerin plaklarından tekrar ekstraksiyon yapılmış ve PCR düzeneği kurulup, elektroforez yürütmeleri yapılmıştır. Ardından, daha önceden yapılan PCR çalışmasında pozitif olarak gözlemlenen 1 adet örnek, pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu defa, 65 adet örnek için kullanılan M13U (5'-GTT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3') ve M13L (5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3') primerleri kullanılmıştır.



Resim 9. 38 CTX-M pozitif suş ve 1 adet pozitif kontrol olarak kullanılan suşun CTX-M primerleri ile kontrolünün yapılması.

Yapılan PCR ve yürütmenin ardından, pozitif kontrol olarak kullanılan örnek hariç, yüklenen 38 örneğin tümünün pozitif bantlanma verdikleri gözlemlenmiştir.

Bunun üzerine, elde edilen 65 pozitif örneğe sekanslama testleri uygulanmış ve 61 adet CTX-M Grup-1 örneğin sekanslama sonuçları şu şekilde alınmıştır. Buna göre gönderilen suşların 31 tanesi: CTX-M 15, 17 tanesi: CTX-M 28, 9 tanesi: CTX-M 3, 2 tanesi: CTX-M 22, 2 tanesi: CTX-M 33, 2 tanesi: CTX-M 42.

Tablo 16. Mikroorganizmalara göre β laktamaz dağılımları.

Mikroorganizma	β laktamaz	Grup	N	%
<i>E.coli</i>	CTX-M 2	Grup-2	1	1,54
<i>E.coli</i>	CTX-M 9	Grup-9	1	1,54
<i>K.pneumoniae</i> , <i>C.freundii</i>	CTX-M 3	Grup 1	9	13,84
<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 15	Grup 1	31	47,69
<i>E.coli</i>	CTX-M 22	Grup 1	2	3,08
<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 28	Grup 1	17	26,15
<i>E.coli</i>	CTX-M 33	Grup 1	2	3,08
<i>E.coli</i>	CTX-M 42	Grup 1	2	3,08
			65	%100

Tablo 17. Suşlara göre beta-laktamaz dağılımları.

Suş Adı:	Mikroorganizma	β laktamaz	Grup
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K11P	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M-28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
HB 82	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
EU082208	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M-28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
AJ549244.1	<i>E.coli</i>	CTX-M-28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
S-334	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M-3	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
AJ549244.1	<i>E.coli</i>	CTX-M-28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
pCTX-M42	<i>E.coli</i>	CTX-M-42	Grup 1
K11P	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M-28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M-15	Grup 1

Suş Adı:	Mikroorganizma	β laktamaz	Grup
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
pCTX-M42	<i>E.coli</i>	CTX-M 42	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
S-334	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 3	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
S-334	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 3	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
AJ549244.1	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K11P	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 28	Grup 1
PE-4	<i>E.coli</i>	CTX-M 22	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
S-334	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 3	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
PE-4	<i>E.coli</i>	CTX-M 22	Grup 1
K11P	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 28	Grup 1
pGR2439	<i>E.coli</i>	CTX-M 33	Grup 1
S-334	<i>C.freundii</i>	CTX-M 3	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
S-334	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 3	Grup 1
K11P	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 28	Grup 1
DQ299902.1	<i>E.coli</i>	CTX-M 3	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
P30	<i>K.pneumoniae</i>	CTX-M 3	Grup 1
ICB154/06	<i>E.coli</i>	CTX-M 2	Grup 2
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
pGR2439	<i>E.coli</i>	CTX-M 33	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
743-D	<i>E.coli</i>	CTX-M 9	Grup 9
AJ549244.1	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
AJ549244.1	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
DQ299902.1	<i>E.coli</i>	CTX-M 3	Grup 1
U050259	<i>E.coli</i>	CTX-M 28	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1
K-20	<i>E.coli</i>	CTX-M 15	Grup 1

5. TARTIŞMA

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakteriler rutin testlerde duyarlı sonuçlar verseler de, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerle tedavide sorun çıkartmaktadırlar. Bu durum tedavi başarısızlıklarına, morbidite ve mortalite artışlarına neden olmaktadır (50-52). Duyarlılık testlerinde asıl amaç antibiyotiklere direnci saptamaktır (53). Bu nedenle rutin testlerle saptanmaları sorun olabilen GSBL üreten bakterilerin saptanması için bazı ek testler önerilmektedir (2,11,52,54-58).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşları saptamak için birçok yöntem bulunsa bile, çalışmamızda kullandığımız CLSI tarama ve doğrulama testleri özellikle *E.coli*, ve *K.pneumoniae* suşları için rutinde kullanılan, yapılması kolay ve en iyi standardize edilen testlerdir (57, 58). Plazmidlerle aktarılabilen GSBL'ler karbapenemler dışındaki β -laktam antibiyotikleri, özellikle de üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolizle etkisizleştirebilmektedir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aracılı direnç, plazmidler aracılığıyla türler arasında aktarılabilmekte, hastanelerde salgınlar oluşturmaktadır. Bu durum tedavi başarısızlığında, hastanede kalış süresinin uzamasında ve mortalite oranlarının artmasında önemli roller üstlenmektedir. Üstelik bu direncin giderek yaygınlaşması da bu sorunu büyütmektedir.

Günümüzde tanımlanan GSBL'lerin sayısı farklı türlerde (TEM, SHV, CTX-M, PER, OXA... gibi) iki yüzü aşmıştır. *K. pneumoniae* ve *E. coli* suslarında GSBL pozitifliğinin sıklığı dünyanın her yerinden bildirilmektedir. Rutin laboratuvarlarda GSBL varlığı tespit edilemeyebilir; bunun için bazı özel testler gerekir. Bunlar; çift disk sinerji metodu, üç boyutlu test, E-test, moleküler yöntemler ve otomatize sistemlerdir. Bu yüzden GSBL pozitiflik oranlarının bilinenden farklı olduğu düşünülmektedir (61-65). GSBL tarama yöntemleri içinde kullanılan "çift disk sinerji metodu", özgüllüğü yüksek ve kolay uygulanabilir bir methodur. Ancak CLSI, GSBL varlığının fenotipik doğrulanmasında araştırılmasında kombine (modifiye) disk difüzyon testinin kullanılmasını önermektedir (63,64).

Çalışmamızla yakından ilgili olduğu düşünülen ve ülkemizde nozokomiyal kökenli *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında GSBL sıklığını araştırarak çeşitli araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar, Tablo.18'de özetlenmiştir.

Tablo 18. Ülkemizde nozokomiyal kökenli *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında GSBL sıklığını araştırarak çeşitli araştırmalar.

Araştırmacı	Çalışma Yılı	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		%	%
Demirağ ve ark. (64)	2001	15	47
Dizbay ve ark. (65)	2004	12	33,3
Bayramoğlu ve ark. (66)	2001	5,6	32,8
Özkan ve ark. (67)	2002	39	66
Tünger ve ark. (68)	1998	21,5	49,3
Bülüç ve ark. (69)	2000-2002	14	48
Zarakolu ve ark. (72)	2006	28	47

Bununla birlikte, Kızırgil ve ark. (72) kan kültürlerinden soyutlanan 166 enterik basil üzerinde yaptıkları çalışmada %35'inin GSBL ürettiğini bildirmişlerdir.

Korten ve ark. (73) dokuz merkezde 5208 *Enterobacteriaceae* izolatında GSBL oranını %48.7 olarak bildirmişlerdir.

Ünver ve ark. (78) genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin prevalansının saptanması konulu çalışmalarında GSBL üreticisi 38 bakterinin 29'unu (%76.3) *Escherichia coli*, yedisini (%18.4) *Klebsiella pneumoniae*, ikisini ise (%5.3) *Klebsiella oxytoca* olarak bildirmişlerdir.

Dizbay, Bülüç ve Eroğlu'nun çalışmalarında da GSBL pozitif suşlar, bizim çalışmamızda olduğu gibi en çok idrar örneklerinden izole edilmiştir (67,71,75).

Yapılan çalışmalarda bildirilen GSBL oranları *E. coli* suşları için %5.6-39 aralığında, *K. pneumoniae* suşları için %32.8-49.3 aralığında değişmektedir. Bu sonuçlarla çalışmada aldığımız sonuçlar uyumlu bulunmuştur.

Antibiyotik kullanımıyla yakından ilişkili olan GSBL'a bağılı direnç oranları, antibiyotik kullanım politikalarına bağılı olarak ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve aynı hastane içindeki birimden birime değişiklik göstermektedir (76).

Örneğin; Hollanda'da yapılan çok merkezli bir çalışmada *K. pneumoniae* suşlarının %1'inden daha azı GSBL taşırken, Fransa'da bu oran %40'dır (2). Rusya'da Edelstein ve ark. (77) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada ise *K. pneumoniae* suşlarının %60.8'inde GSBL saptamışlardır. Japonya'dan 196 farklı merkezin katıldığı bir çalışmada ise *K. pneumoniae*'ların %0.003'ünden azında GSBL üretimi saptanmış olup Asya ülkeleri Kore, Tayvan ve Hong Kong için bu oran %4.8 ile %12 arasında değişmektedir (2).

Öte yandan, GSBL üreten bakterilerde enzim tipleri yeryüzünün coğrafi bölgelerine, aynı coğrafi bölgelerde ise değişik merkezlere göre farklılıklar göstermektedir (81,82). Bu sebeple, bu tür suşlarda enzim tiplerinin belirlenebilmesi, epidemiyolojik yönden büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde GSBL oranlarının yüksekliğine rağmen enzim tiplerine yönelik çalışmaların sayısının oldukça az olduğu göze çarpmaktadır. Gülay ve ark. 2000 yılında izoelektrik odaklama yöntemi ile yaptıkları çalışmada, nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole ettikleri *K. pneumoniae* kökenlerinde birden dörde kadar değişen sayılarda enzim varlığı gözlemişlerdir (83). Bu enzimler için en sık belirlenen izoelektrik noktalar (pI) 7.6 olmuştur. Bunun yanı sıra pI 8.4, 8.2, 5.4, 7.8 olan enzimler de belirlenmiştir.

Benzer şekilde, Löker, 2000 yılında izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* kökenlerinin %92'sinde pI'sı 7.6 olan bant belirlemiş, bakterilerin antibiyotik direnç fenotipleri göz önüne alındığında bu enzimin SHV-2 olabileceği düşünmüştür. Aynı çalışmada %56 oranında ikinci sıklıkla pI'sı 5.4 olan bant bulunmuş, bu bantın TEM-1 enzimine ait olduğu düşünölmüştür (84). Aynı çalışmada %56 oranında ikinci sıklıkla pI'sı 5.4 olan bant bulunmuş, bu bantın TEM-1 enzimine ait olduğu düşünölmüştür (85).

Durmaz ve ark. *K. pneumoniae*, *Citrobacter spp.*, *E. coli* ve *Enterobacter spp.* kökenlerinde sırasıyla pI'ları 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 olarak belirlemiş, bunların da sırasıyla SHV-3 benzeri, SHV-2/6 benzeri, SHV-4 benzeri, SHV-5 benzeri enzimlere ait

olduğunu bildirmiştir. SHV-2 ve SHV-6 türevi olan GSBL'lar bu çalışmada en sık rastlanan enzim grubu olarak bulunmuştur (85).

Gülmez ve ark.'nın 2004'te yaptıkları bir başka çalışmada, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan bir *Morganella morganii* suşunu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve izoelektrik odaklama yöntemiyle ile CTX-M tipi GSBL varlığı yönünden araştırmışlar, ve izoelektrik nokta değerinin (pI): >8 olduğunu, pI>8 değerinin CTX-M tipi enzim ile uyumlu olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmanın daha sonraki aşamasında dizi analizi ile belirlenen CTX-M tipi enzimin CTX-M grup I'de yer aldığını saptamışlardır (86).

Gülay ve ark. 23 *K. pneumoniae* kökeninin dâhil olduğu çok merkezli bir çalışmada *K. pneumoniae* kökenlerinde CTX-M prevalansını %82.6 arasında bulmuşlar, ülkemizde *Enterobacteriaceae* ailesine ait mikroorganizmalarda CTX-M enzimlerinin yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Nükleotid dizi analizi sonucuna göre bunu CTX-M 3 olarak belirlemişlerdir (87).

Benzer bir başka çalışmada Ünver ve ark. Nisan-Aralık 2006 tarihleri arasındaki Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi' nin çeşitli polikliniklerinden parazitolojik inceleme amacıyla gönderilen 250 dışkı örneğini, GSBL üreten tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri açısından PCR yöntemi ile ile blaTEM, blaSHV ve blaCTX-M genlerinin varlığı bakımından özgün primer setleri ile araştırmışlardır. Sonuç olarak; GSBL üreticisi 38 kökenin 34'ünde (%89.4) blaCTX-M geni, 29'unda (%76.3) blaTEM geni ve 12'sinde (%31.5) blaSHV geni saptanmıştır. blaCTX-M oranı 28 GSBL üreticisi *E.coli* kökeninin %96,4'ünde bulunarak yine en yüksek oranda saptanan GSBL geni olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar son yıllarda GSBL epidemisinde görülen eğilimi yansıtmaktadır (88).

Ülkemizdeki ilk CTX-M 15 kodlayan *Klebsiella pneumoniae* suşunu göstermesi yönüyle önem taşıyan bir başka çalışma da 2003 yılında, Lartigue ve ark. tarafından yapılmıştır. Çalışmada İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatmakta olan bir hastadan alınan idrar örneği kullanılmış ve yapılan identifikasyon sonrası izole edilen *Klebsiella pneumoniae* (KP7881) suşu PCR yöntemi ile tespit edilerek, ardından izoelektrik odak değeri ölçüldüğünde, bu değer 8,6 bulunduğundan, bunun da CTX-M 15 geni ile uyumluluğu gösterilmiştir (89).

Böylelikle, Hindistan (90), Japonya, Kanada, Rusya, Bulgaristan, Polonya (90) ve Fransa (91)'nin ardından Türkiye'de de *Klebsiella pneumoniae* suşundan elde edilen ilk CTX-M 15 geni literatüre geçmiştir.

Eroğlu ve ark.'nın 2007 yılında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, bakterilerin çoğunda birden fazla enzim varlığı gözlemişlerdir. Her iki *Klebsiella* türünden elde edilen enzimler için en sık belirlenen pI, 7.6 (17/56), 7.2 (15/56) ve 8.4 (12/56) olmuştur. Bunu sırasıyla 8.6, 8.2, 5.6, 7.0, 7.8, 8.0, 5.4, 8.3, 8.8, 9.0, 5.9 ve 6.8 izlemiştir. *K. pneumoniae* kökenlerinde belirlenen pI 8.0, 8.3, 8.8 ve 9.0 *K. oxytoca* kökenlerinde gözlenmemiştir. Kökenlerde belirlenen enzim izoelektrik noktaları yorumlandığında literatür ile uyumlu olarak SHV ve CTX-M enzimleri daha sık olarak bulunmuştur (93). CTX-M enzimleri için tanımlanan pI'lar gözden geçirildiğinde, bu çalışmada kökenlerin 12'sinde pI 8.4 belirlenmiş olması, buna uygun olan CTXM 3,4,6,7 ve 21'in araştırılması gerektiği şeklinde yorumlanabilir. Bundan sonra en sık gözlenen pI 8.6; CTX-M 15'e, pI 8.3; CTX-M 20'ye aittir (94). Kökenlerin altısında görülen pI 8.2 hem SHV hem de CTX-M enzimlerinde gözlemlenmiştir. Bu kökenlerin PCR yöntemi ile doğrulanması gerekmektedir. pI 8.8; CTX-M 5 ve pI 9.0; CTX-M 15 için tanımlanmış, buna göre izolatlarda belirlenebilen CTX-M enzimleri, CTX-M 15, CTX-M 20, CTX-M 5 olmuştur. pI 8.4'in CTX-M 3,4,6,7 ve 21 enzimlerinden hangisine ait olduğunun belirlenmesi için uygun oligonükleotid primerlerle PCR yöntemi ile ileri araştırma yapılması uygun görülmüştür.

Hacettepe Üniversitesi'nden Demirbakan ve ark.'nın Haziran-2004, Ocak 2005 tarihleri arasını kapsayan, Türkiye'den altı merkezin katıldığı ve kan örneklerinden izole edilen 457 *Escherichia coli*, 390 *Klebsiella pneumoniae*, 194 *Pseudomonas aeruginosa* ve 155 *Acinetobacter baumannii* suşları ile yaptıkları çalışmalarında, %71,4 oranı ile CTX-M enzimi en sık rastlanılan enzim olarak bulunurken, bunu TEM (49.4%) ve SHV (46.7%) enzimleri izlemiştir. Ek olarak, CTX-M 15 % 69,4'lük oranıyla en sık tespit edilen CTX-M türü olarak bulunmuş, bunu %28,6'lık oranla CTX-M 3 ve %2'lik oranla CTX-M 1 enzimleri izlemiştir. Ek olarak, CTX-M 15 %69,4'lük oranıyla en sık tespit edilen CTX-M türü olarak

bulunmuş, bunu %28,6'lık oranla CTX-M 3 ve %2'lik oranla CTX-M 1 izlemiştir (95).

Bourouis ve ark.'nın 2005'te Tunus Askeri Hastanesi, yoğunbakım ünitesinde yaptıkları bir başka çalışmada, bir multidrug-dirençli *Enterobacter cloacae* izolatında (BF5011) çift disk sinerji yöntemi ile GSBL saptanmış, daha sonra PCR reaksiyonu ve sekanslama yöntemleri ile, bu suşta CTX-M 9 tipi GSBL tespit edilmiş, ve yapılan izoelektrik odaklama testi ile doğrulanarak, vakanın Tunus'ta bildirilen ilk CTX-M 9 vakası olduğu bildirilmiştir (96).

Lee ve ark.'nın Kore, Seul Üniversite Hastanesi'nde Ocak-2005, Ekim-2007 tarihleri arasında yaptıkları başka bir çalışmada, kan örneklerinden izole edilen 760 *E. coli* ve 379 *K. pneumoniae* suşları ile çift disk sinerji testi ile *E. coli* suşlarında %8.7 (66/760) ve *K. pneumoniae* suşlarında %11.3 (43/379) oranlarında GSBL pozitiflik tespit edilmiştir. Çalışmanın ileriki aşamasında PCR yöntemi kullanılarak *E. coli* suşlarında 60/66 (%90.9) oranında ve *K. pneumoniae* suşlarında ise 9/43 (%20.9) oranlarında bla(CTX-M) geni saptamışlardır. Daha sonra yapılan detaylı araştırmada, CTX-M 14'ün, *E. coli* (n=32) ve *K. pneumoniae* (n=6) suşlarında en sık görülen CTX-M tipi olduğu ve ardından CTX-M 15'in *E. coli* suşlarında tespit edilen ikinci en sık CTX-M tipi olduğu gözlemlenmiştir. Ancak CTX-M 15 pozitifliğine *K. pneumoniae* suşlarında rastlanmamıştır. Ek olarak, aynı çalışmada CTX-M 24 (n=2), CTX-M 65 (n=2), CTX-M 27 (n=1), ve CTX-M 32 (n=1) suşları da tiplendirilerek, Kore için bildirilen ilk suşlar olarak literatürde yerlerini almışlardır (97).

Abbassi ve ark.'nın 2008 yılında yaptıkları, Tunus Kemik İliği Transplantasyon Merkezi'nden elde edilen GSBL pozitif dokuz *K. pneumoniae* ve iki *E. coli* suşlarını kapsasayan çalışmalarında, pulse field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile suşların tamamının CTX-M 15 geni barındırdığını rapor etmişlerdir (98).

Ben Achour ve ark.'nın 2008 yılında yaptıkları bir araştırmada ise, Tunus Askeri Hastanesi yoğunbakım ünitesinden izole edilen, beta-laktamlara, aminoglikozidlere, kinolonlara, fenikollere, ve tetrasiklinlere dirençli bir *K. pneumoniae* suşundaki GSBL tipi, PCR ürününün sekanslanması ve izoelektrik odaklama yöntemi kullanılarak CTX-M 28 olarak bulunmuş, CTX-M 28 ile CTX-M

15'in birbiri ile çok yakın benzerlikler gösterdiği belirtilerek, Tunus'ta gösterilen ilk CTX-M 28 geni olarak rapor edilmiştir (99).

Avusturya'dan Prelog ve ark.'nın Ocak-Temmuz 2006 tarihleri arasındaki çalışmalarında, antibiyotik duyarlılık testleri ile CTX-M üreten *E. coli* suşları tespit edilmiş ve blaCTX-M multipleks PCR teknikleri kullanılmış, ayrıca klonal ilişkilendirme için PFGE tekniği kullanılmıştır. Buna göre; 2042 *E. coli* izolatından 20 tanesi (16 idrar, 4 kan kültürü) CTX-M 1 bakımından pozitif bulunurken, CTX-M 2, CTX-M 9 veya CTX-M 15 genleri açısından herhangi bir pozitiflik tespit edilememiştir (100).

SONUÇ

Beta laktamaz inhibitörlerine sonradan direnç en sık *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında oluşmaktadır. Bunun en sık nedenleri küçük ve çok kopyalı plazmidler ya da güçlü promotörler nedeniyle oluşan aşırı penisilinaz yapımı, inhibitörlere dirençli CTX-M türevi enzimler ve/veya permeabilite azalmasıdır.

Bununla birlikte tüm inhibitörler sayılan bu direnç mekanizmalarından az ya da çok etkilenirler. Özellikle aşırı beta-laktamaz yapımı ve inhibitörlere dirençli enzimler tüm inhibitörlere direnç sağlayabilmektedir. Tüm bu nedenlerle inhibitörlü kombinasyonlarla oluşacak çapraz direnç konularında daha ayrıntılı çalışmalara gerek olduğu açıktır.

Bu gibi çalışmalar ile birlikte,

- Duyarlılık deneylerinde birden fazla inhibitörlü kombinasyonu denemek gerekir mi?
- Birden fazla kombinasyon denendiğinde, kombinasyonlardan birine duyarlı ama diğerine dirençli bulunan bir sonuç nasıl yorumlanacaktır?

Sorularına yanıt bulunabileceği gibi, beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonların, in-vitro duyarlı bulunsalar bile, GSBL üreten bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde neden etkisiz kalabildikleri de açıklanabilir.

Bununla birlikte, nozokomiyal enfeksiyonlu hastalardan soyutlanan *Enterobacteriaceae* suşlarında saptanan GSBL oranlarının azımsanmayacak oranlarda olduğu ve tedavi protokollerinde dikkate alınmayı gerektirdiği görülmektedir. Bu nedenle nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak soyutlanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL varlığının araştırılması ve buna uygun tedavi protokolleri, bu hastaların tedavi başarılarını arttıracaktır.

Sonuç olarak; Afyonkarahisar bölgesindeki nozokomiyal suşlardan en sık saptanan CTX M genotipinin CTX-M 15 olduğu, ikinci sıklıkla da CTX-M 28 in gözlendiği, bu verinin başka çalışmalar ile de desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Öneriler;

Ülkemizdeki GSBL oranlarının yüksekliği göz önüne alınırsa özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL üretiminin gösterilmesinde NCCLS/CLSI tarafından önerilen iki doğrulama yöntemlerinden birinin rutin uygulanması oldukça akılcı görünmektedir.

Özellikle GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında, antibiyotik direnci ile birlikte GSBL varlığının belirlenmesi, tedavide uygun antibiyotik seçimini kolaylaştıracağı gibi, kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişiminin de önlenmesinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Ivanov DV, Egorov AM. *Spreading and mechanisms of antibiotic resistance of microorganisms, producing beta-lactamases. Molecular mechanisms of resistance to beta-lactams of Klebsiella spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections. Biomed Khim. 2008 Jan-Feb;54(1):104-13.*
2. Bradford PA. *Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.*
3. Bush K. *New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32:1085-9.*
4. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, et al. *Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum -lactamase detection methods. J Clin Microbiol 2001; 39(8):2864-72.*
5. Sanders CC, Sanders WE Jr. *Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992; 15: 824-39.*
6. Bal Ç. *Beta-laktamazlar: Güncel durum, Flora 2003;8(2):111-23.*
7. Jacoby G, Han P: *Detection of extended-spectrum b-lactamases in clinical isolates of K.pneumoniae and E.coli. J Clin Microbiol 1996;34(4):908-11.*
8. Jan A. Patzer, Danuta Dzierzanowska, Philip J. Turner *Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a paediatric intensive care unit in Warsaw: results from the MYSTIC programme (1997-2007). J Antimicrob Chemother.2008;62(2):369-75.*
9. Dolapci I, *Extended-spectrum beta-lactamases: their role in clinical microbiology laboratory, treatment and infection control. Mikrobiyol Bul. 2005;39(2):229-40.*

10. Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. *Problems with detection of beta-lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. Infect Dis Clin North Am* 1993; **7:411-23**.
11. Livermore DM. *Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev* 1995; **8:557-84**.
12. WHO (World Health Organization) *Emerging issues in water and infectious disease. Geneva: World Health Organization (WHO). (2003)*.
13. Bilgehan H. *Enterobacteriaceae, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi (4) 2004; 425-454*.
14. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O ve ark. *Hastane İnfeksiyonu Etkeni Pseudomonas aeruginosa' larda Çeşitli Antibiyotiklere Direnç ve İBL Yapımının Araştırılması, KLİMİK Derg* 2004; **17(1): 47-9**.
15. Medeiros AA. B-lactamases. *Br Med Bull* 1984; 40: 18-27.
16. Bush K, Jacoby G. *Nomenclature of TEM β -lactamases. J Antimicrob Chemoter* 1997; **39:1-3**
17. Livermore DM. *β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Rev* 1995: **8:557-584**
18. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. *Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem- hydrolyzing beta-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae by disk tests. J of Clin Microbiol* 2006: **6: 1971-1976**
19. Philip J. Turner, *Extended-Spectrum b-Lactamases. CID* 2005;**41(Suppl 4):275**.
20. Eckert, C., V.Gautier, M. Saladin Allard, et al. *Dissemination of CTX-M type β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. Antimicrob. Agents Chemoter.* 2004: **48: 1249-1255**.

21. Eisner, A., E. J. Fagan, G. Feierl, H. et al. *Emergence of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M extended-spectrum Beta-lactamase in Austria. Antimicrob. Agents Chemother. . 2006: 50:785–787.*
22. Lartigue, M. F. N. Fortineau, and P. Nordmann. *Spread of novel expanded-spectrum -lactamases in Enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, France. Clin. Microbiol. Infect. 2005: 11:588–591.*
23. Lavigne, J. P., H. Marchandin, J. Delmas, N. et al. *qnrA in CTX-Mproducing Escherichia coli from France. Antimicrob. Agents Chemother. 2006: 50:4224–4228.*
24. Saladin, M., V. T. Cao, T. Lambert, J. et al. *Diversity of CTX-M -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol. Lett. 2002: 209:161–168.*
25. Stürenburg E, Mack D. *Extended spectrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J of Infect 2003; 47: 279-95.*
26. Welthagen GF, Poirel L, Nordman P. *Ambler Class A extended-spectrum B-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: Novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 45:183-9.*
27. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). *ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. In: Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar; Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; 5-13.*
28. Demir N. *Gram Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üretimine Katkıda Bulunan Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Uzmanlık Tezi Dr. Nagihan DEMİR: S-16.*

29. Livermore DM. *Beta lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev* 1995; **39**: 1211-33.
30. Nordman P, Guibert M. *Extended spectrum beta lactamases in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology* 1998; **42** :128-31.
31. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, et al. *Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents Chemother* 2001; **45**: 2615-20.
32. Bonnet R. *Minireview: Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother* 2004;**48**:1-14.
33. Ângela N, Rafael C, Teresa M, et al. *Mutational Events in Cefotaximase Extended-Spectrum β -Lactamases of the CTX-M-1 Cluster Involved in Ceftazidime Resistance Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(7): 2377–2382.*
34. Tzouveleki, L. S., E. Tzelepi, P. T. Tassios, et al. *CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int. J. Antimicrob. Agents* 2000: **14**:137–142.
35. Sophie B, Francois-Xavier W, Axel C, et al. *Clonal Emergence of Extended-Spectrum β -Lactamase (CTX-M 2)-Producing Salmonella enterica Serovar Virchow Isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003) J Clin Microbiol* 2006;**44**:2897-903.
36. Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, et al. *Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M 15-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Sofia, Bulgaria. Clin Microbiol Infect* 2004;**10**:752-5.
37. Danel F, Hall LM, Gur D, et al. *Liver Transferable production of PER-1 β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob Chemoter.* 1995;**35**:281-294.

38. Gülay Z. *ESBL'lerin tanı yöntemleri*.In: Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). *Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; **13-26**.
39. Alvarez B, Houpijian H, Mezzasoma M, et al. *What does the future hold for clinical microbiology? (Eds) General Microbiological Informations 2004; Article: 22: 3-4*.
40. Wolk D, Mitchell S, Patel R. *Principles of molecular microbiology testing methods*. *Infect Dis Clin North Am*. 2001;**15(4):1157-204**.
41. Louie M, Cockerill FR. *Susceptibility testing. Phenotypic and genotypic tests for bacteria and mycobacteria. 3rd. Infect Dis Clin North Am*. 2001 Dec;**15(4):1205-26**.
42. Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, et al. *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains by PCR-RFLP of SPA gene: a reference laboratory perspective*. *Indian J Med Microbiol*. 2009; **27(2):116-22**.
43. Van de Goor LH, Panneman H, van Haeringen WA. *A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci*. *Anim Genet*. 2009; **8:752-5**.
44. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, et al. *DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection*. *Butcher PD. J Clin Microbiol*. 2004; **42(12):5811-8**.
45. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. *Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges*. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;**14(4):643-58, table of contents**.
46. McPherson & Pincus: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21st edition: *Molecular Pathology of Infectious Diseases*; 2006; **112-115**.

47. Dr. Neval Yurttutan Uyar. Moleküler Yöntemlerin Mikrobiyolojide Uygulanması: <http://www.duzen.com.tr/artFiles/molekulermikro.pdf>
48. Medeiros AA. *Evaluation and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997; 24 (Suppl 1): 19-45.*
49. Sirot DL, Golstein FW, Soussy CJ et al. *Resistance to cefuroxime and seven other β -lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3 year survey in France. Antimicrob Agents Chemoter 1992; 36: 1677-1681.*
50. Kim YK, Pai H, Lee HJ et al. *Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in children: epidemiology and clinical outcome, Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1481*
51. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al: *Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum betalactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, J Clin Microbiol 2001;39(6):2206-12.*
52. Pitout JD, Laupland KB: *Extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern, Lancet Infect Dis 2008;8(3):159-66.*
53. Sanders CC. *ARTs versus ASTs: where are we going? J Antimicrob Chemother 1991;28(5):621-3.*
54. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, et al. *Phenotypic detection of extended-spectrum betalactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide, Clin Microbiol Infect 2008;14(Suppl 1):90-103.*
55. Göker G: *Poliklinik hastaların çeşitli klinik örneklerinden etken olarak izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella cinsi bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul (2007).*

56. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, et al. *Extended broad-spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns, Rev Infect Dis 1988;10(4):867-78.*
57. Moland ES, Kim SY, Hong SG, et al. *Newer b-lactamases: Clinical and laboratory implications, Part I, Clin Microbiol Newslett, 2008;30(10):71-7.*
58. Moland ES, Kim SY, Hong SG, et al. *Newer b-lactamases: Clinical and laboratory implications, Part II, Clin Microbiol Newslett 2008;30(11):79-85.*
59. Çeviri editörü D Gür: *Clinical and Laboratory Standards Institute Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları: Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2008: 18. Bilgi Eki*
60. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, et al. *Phenotypic detection of extended-spectrum betalactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide, Clin Microbiol Infect 2008;14(Suppl 1):90-103.*
61. Akova M. *Dikkat: Genislemis spektrumlu β -laktamaz (GSBL) var! ANKEM Derg 2004;18(Ek2):98-103.*
62. Schwaber JM, Raney PM, Rasheed JK, et al. *Utility of NCCLS Guidelines for Identifying Extended-Spectrum- β -Lactamases in Non-Escherichia coli and Non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2004; 42:294-8.*
63. Ülkar ÜGB, Tülek N, Mert A. *Gram-olumsuz basillerde genislemis spektrumlu β -laktamaz saptanmasında çift disk sinerji ve E-Test yöntemleri. İnfek Derg 1999;13:385-90.*
64. Köroğlu M, Tekerekoğlu MS, Durmaz B, ve ark. *Gram negatif çomaklarda Genislemiş spektrumlu Beta-laktamaz varlığını saptamada farklı yöntemlerin karşılaştırılması. ANKEM Derg 2001;15:46-52.*
65. Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, et al. *Detection of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains producing extended- spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol 1994;32:691-6.*

66. Demirağ K, Kizirgil A, Özden M, ve ark. *Hastane ve toplum kökenli Klebsiella pneumoniae ve Escherichia coli suslarında genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz sıklığının araştırılması. ANKEM Derg 2001;15:748-52.*
67. Dizbay M, Karakus R, Arman D. *Hastane infeksiyonu etkeni Gram- negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının saptanması. Hast İnfek Derg 2004;8:40-4.*
68. Bayramoğlu G, Karadağ A, Uyar R, ve ark. *Hastane infeksiyonu etkeni Klebsiella spp. ve Escherichia coli suşlarında genişlemiş spektrumlu betalaktamaz varlığının araştırılması. ANKEM Derg 2001;15:730-4.*
69. Özkan Ç, Oldacay M, Erdem G. *Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suslarında genişlemiş spektrumlu β -laktamaz sıklığı. ANKEM Derg 2002;16:65-8.*
70. Tünger A, Hilmioğlu S, Dibek AM, ve ark. *Hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan Klebsiella pneumoniae ve Escherichia coli kökenlerinde genişlemiş spektrumlu Beta- laktamaz sıklığı. İnfek Derg 1998;12:165-8.*
71. Bülüç M, Gürol Y, Bal Ç. *Genişlemiş spektrumlu Betalaktamaz oranları: 2000-2002. Türk Mikrobiol Cem Derg 2003;33:31-4.*
72. Kizirgil A, Yakupoğulları Y, Senol FF, ve ark. *Kan kültürü örneklerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten enterik basillerin prevalansı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 2005;19:111-4.*
73. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, ve ark. *Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Sep 19.*
74. Zarakolu P, Haşçelik G, Unal S. *Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004). Mikrobiyol Bul 2006;40:147-54.*

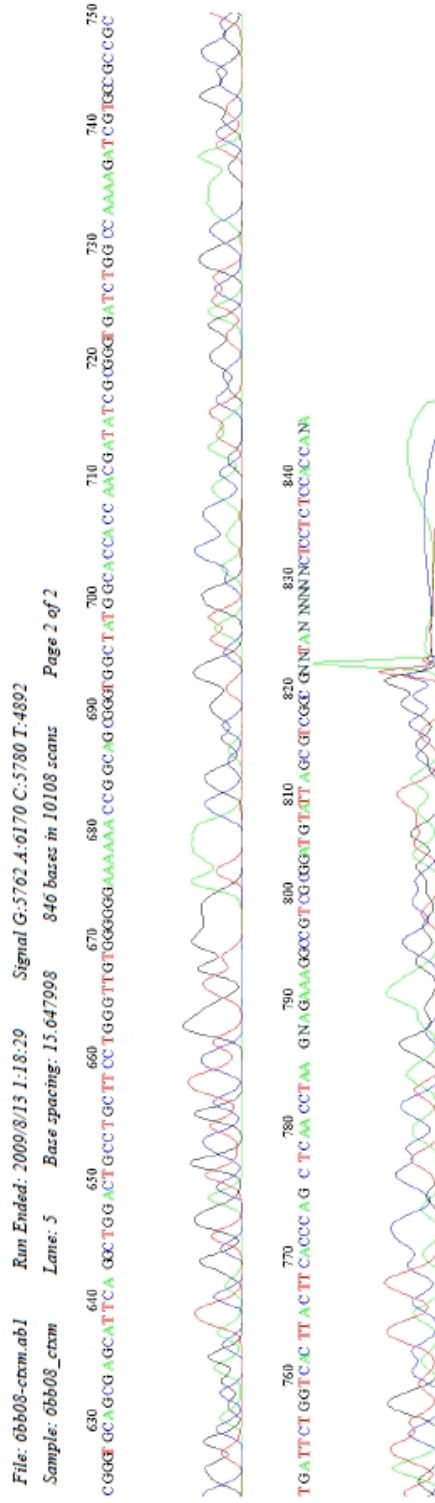
75. Eroğlu Ö, Beğendik Cömert F, Külah C, ve ark. *Genişlemis spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Klebsiella pneumoniae ve Klebsiella oxytoca kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2007;37:76-84.*
76. Tünger Ö, Arısoy Sivrel A, Özbakkaloğlu B, ve ark. *Nozokomiyal Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal betalaktamaz varlığının araştırılması. Flora 2001; 6: 37-41.*
77. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, et al. *Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3724-32.*
78. Ünver D, Küçükbasmacı Ö, *Salgın dışı durumlarda dışkıda genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamaz üreten enterobacteriaceae üyelerinin prevalansının saptanması. Türk Mikrobiyol Cem Derg; 2008; 38 (3-4) : 126-131.*
79. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan Cb, et al. *Dissemination of CTX-M 15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of Escherichia coli in a university hospital in Istanbul, Turkey. J Clin Microbiol. 2008; 46:1110-2.*
80. Taşlı H, Bahar H. *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.*
81. Livermore DM. *Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol. Rev. 1995; 8: 557.*
82. Gur D, Pitt TL, Hall LMC, et al. *Livermore DM: Diversity of Klebsiella with extended-spectrum beta-lactamases at a Turkish university hospital. J Hosp infect 1992; 22: 163.*

83. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, et al. *High prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among Klebsiella pneumoniae strains isolated at a University Hospital in Turkey. J Chemother* 2000; **12**: 145.
84. Löker KE: *Hastane infeksiyonlarından izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella suşlarında genişlemiş spektrumlu betalaktamaz sıklığının saptanması ve izoelektrik odaklama yöntemi ile tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi, GATA, Ankara, 2000.*
85. Durmaz R, Durmaz B, Koroglu M, ve ark. *Detection and typing of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of the family Enterobacteriaceae in a medical center in Turkey. Microb Drug Resist* 2001; **7**: 171.
86. Gülmez D, Metan G, Köseoğlu Eser Ö, ve ark. *Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Salgılayan Morganella morganii: Türkiye'den İlk Olgu Sunumu, Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, [S06] Sözlü Sunu 2.*
87. Gülay Z, Terek G, Eraç B, ve ark. *High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of Enterobacteriaceae in Turkey [özet p-752]. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Kongre Kitabı, 2004: 187.*
88. Ünver D, Küçükbaşmacı Ö. *Salgın dışı durumlarda dışkıda genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinin prevalansının saptanması. Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008; **38 (3-4)**, 126-131.
89. M.-F. Lartigue, L. Poirel, C. Héritier, et al. *First description of CTX-M 15-producing Klebsiella pneumoniae in Turkey. DOI: 10.1093/jac/dkg335 Advance Access publication 15 July 2003.*
90. Karim, A, Poirel L, Nagarajan S. et al. *Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M 3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiology Letters* 2001; **201**, 237-41.

91. Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W. et al. *Countrywide spread of CTX-M 3 extended spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002;46, 151–9.*
92. Neuwirth, C., Siebor, E., Pruneaux, M. et al. *First isolation of CTX-M 15-producing Escherichia coli from two French patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003; 51, 471–3.*
93. Eroğlu Ö, Cömert B.F, Külah C, ve ark. *Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Klebsiella pneumoniae ve Klebsiella oxytoca kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37 (2) : 76-84.*
94. Bonnet R: *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother 2004; 48; 1: 1.*
95. Gür D, Gülay Z, Akan OA, ve ark. *Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. PMID: 19149075 PubMed - indexed for MEDLINE 2: Mikrobiyol Bul. 2008;42(4):537-44.*
96. Bourouis A, Dubois V, Coulange L, et al. *First report of CTX-M 9 in a clinical isolate of Enterobacter cloacae in a Tunisian hospital. Pathol Biol (Paris). 2009 May 27. Epub ahead of print.*
97. Lee SG, Jeong SH, Lee H, et al. *Spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from a Korean hospital. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Jan;63(1):76-80.*
98. Abbassi MS, Torres C, Achour W, et al. *Genetic characterisation of CTX-M 15-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(4):308-14. Epub 2008 Jul 11.*

99. Ben Achour N, Mercuri PS, Power P, et al. *First detection of CTX-M 28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant Klebsiella pneumoniae strain. Pathol Biol (Paris). 2008 Sep 30. Epub ahead of print.*
100. Prelog M, Fille M, Prodinger W, et al. *CTX-M 1-related extended-spectrum beta-lactamases producing Escherichia coli: so far a sporadic event in Western Austria. Infection. 2008;36(4):362-7.*

Ek 1. 1247 No.lu suşa ait sekans analizi örneği-2



Ek 2. 1247 No.lu suşa ait sekans analiz haritası

GenBank: GQ330540.1
Escherichia coli strain K-20 plasmid IncF::A/C insertion sequence IS26 transposase tnpAIS26 (tnpAIS26) gene, complete cds; insertion sequence ISEcp1, complete sequence; and beta-lactamase CTX-M-15 (blaCTX-M-15) and hypothetical protein genes, complete cds

[Link To This Page](#) | [Help](#) | [Feedback](#) | [Print](#)

