



***E. coli* ve *Klebsiella spp.* SUŞLARINDA
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
BETA LAKTAMAZLARIN
3 FARKLI YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Yasir Necmeddin ÜYÜMEZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Merih ŞİMŞEK
Tez No: 2019-014**

2019 – AFYONKARAHİSAR

T. C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***E. coli* ve *Klebsiella spp.* SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZLARIN 3 FARKLI
YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Yasir Necmeddin ÜYÜMEZ

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Merih ŞİMŞEK**

Tez No: 2019-014

2019 – AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 23/05/2019

Dr.Öğr. Üyesi Merih ŞİMSEK

Jüri Başkanı

Doç.Dr. Beyrullah KENAR

Doç.Dr. Esra ŞEKER

Üye

Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yasir Necmeddin ÜYÜMEZ'in "*E. coli ve Klebsiella spp.* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların 3 Farklı Yöntemle Araştırılması" başlıklı tezi günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Eğitime başladığım andan itibaren beni bu süreçte motive eden, ilminden, tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım, değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Merih ŞİMŞEK'e teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Değerli hocalarımız, Sayın Doç.Dr. Esra ŞEKER'e ve Doç.Dr. Beytullah KENAR'a teşekkürler ve saygılarımı sunuyorum.

Eğitimim süresince bana gösterdikleri fedakârlık, yardım ve katkılarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, her daim destek olan, bilimsel birikimlerini benimle paylaşmaktan hiç çekinmeyen Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde görev yapan değerli hocalarım, Arş. Gör. Ramazan KÖKLÜ'ye, Arş. Gör. Hayriye TOKAY'a, Arş. Gör. Cengiz DEMİR'e, Arş. Gör. Dr. Onur TÜRKYILMAZ'a,

Eğitimim süresi boyunca, her türlü birlik ve beraberlikle, sabır ve neşe ile beraberce çalıştığımız değerli öğrenci arkadaşlarım Süleyman MANGAL'a, Buse CUNDA USTA'ya, Özlem ALBAYRAK'a, Gül ÖZHELVACI'ya ve Hatice ÇINAR'a,

Eğitim sürecim boyunca ve hayatımda tanıdığım, manevi yönden desteklerini ve yardımlarını daima hissettiğim Tıp Fakültesi Hastanesi'nin değerli personelleri Alparslan ARSLAN'a, Savaş ASLAN'a, Barış BİNGÜL'e, Ercan KAHYA'ya, ve görev yapmakta olan diğer personellere, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Öğr. Gör. Davut ÇUFALI'ya

Bu süreç içindeki zorlukları aşmamda bana destek olan, fedakârlık ve sabırlarını benden esirgemeyen, her konuda beni destekleyip hayatımı güzelleştiren ve kolaylaştıran ve her daim yanımda olan babam ve büyük aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
1.1.Escherichia coli 'nin Genel Özellikleri	2
1.1.1.Tedavi, Korunma Ve Kontrol	4
1.2.Klebsiella Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	4
1.2.1.Tedavi	6
1.3.Direnç	7
1.3.1.Doğal Direnç	8
1.3.2.Kazanılmış Direnç	8
1.4.Beta Laktam Antibiyotikler	9
1.4.1.Kromozomal Beta Laktamazlı Antibiyotikler	9
1.4.2.Plazmid aracılı beta laktamazlar	10
1.5.Beta Laktamaz Enzimleri	10
1.5.1.Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)	13
1.6.GSBL Saptama Yöntemleri	14
1.6.1.Tarama testleri	15
1.6.2.Doğrulama testleri	15
1.6.3.Biyokimyasal ve Moleküler yöntemler	18
2.7.Beta Laktamaz İnhibitörleri	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1.Örneklerin Toplanması	21
2.2.Örneklerin Analize Hazırlanmasında Kullanılan Besiyerleri	22
2.2.1.Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)	22
2.2.2.EMB Agar (Merck 1.01347)	23
2.2.3.Nutrient Agar (NA) Besiyeri (Merck 1.05450)	24
2.2.4.Üre Agar Besiyeri (Merck 1.08492)	24
2.3.E. coli ve Klebsiella spp. İdentifikasyonunda Kullanılan Testler ve Besiyerleri	25
2.3.1.Gram Boyama	25
2.3.2.İndol Testi	26
2.3.3.Sitrat Testi	26
2.3.4.Metil Red Testi (MR)	27
2.3.5.Voges-Proskauer (VP) Testi	27
2.3.6.Mio Medium Testi	28
2.3.7.Üreaz Testi	28

2.3.8.Oksidaz Testi (Bactident Oxidase, Merck)	28
2.3.9.Katalaz Testi (Merck Bactident Katalaz (30 ml) - M111351.0001)	29
2.3.10.Hareket Testi (SIM Medium (Merck 1.05470)	29
2.3.11.Simmons Sitrat Agar (Merck 1.02501)	30
2.3.12.Metil Red- Voges Proskauer (MR-VP) Broth (Merck 5712)	31
2.3.13.MR İndikatörü	31
2.3.14.VP İndikatörü	32
2.4.Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi	32
2.4.1.Serum fizyolojik	33
2.4.2.Mc Farland bulanıklılık	34
2.5.Kombine Disk Yöntemi	35
2.6.Çift Disk Sinerji Testi	35
2.7.Üç Boyutlu Test Yöntemi	38
3. BULGULAR	39
4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
6. KAYNAKLAR	57

SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
μ	mikron
μg	mikrogram
ml	mililitre
l	litre
VP	Voges Proskauer
MR	Metil red
H ₂ S	Sülfürik asit
°	Derece
C	Santigrat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
DNase	Deoksiribonükleaz
GSBL	Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz
ÇDST	Çift Disk Sinerji Testi
ÜSi	Üriner Sistem Enfeksiyonu
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
CLSI	Clinical Laboratory Standarda Institute
EMB	Eosin Metilen Blue
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Triptic Soy Broth

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Kombine Disk Pozitif ve Negatif Sonuç.....	35
Şekil 2. 2. Çift Disk Sinerji Testi Pozitif Sonuç.	37
Şekil 2. 3. Çift Disk Sinerji Testi Negatif Sonuç.	37
Şekil 2. 4. Üç Boyutlu Test Yöntemi	38

TABLÖLAR

Tablo 1. 1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması (Bush ve ark., 1995).....	12
Tablo 1. 2. GSBL Varlığını Saptamak İçin Kullanılan Yöntemlerin Üstünlüklerinin Karşılaştırılması	17
Tablo 1. 3. Beta-laktamaz İnhibitörlerinin Etki Spektrumları.....	20
Tablo 2. 1. <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler	21
Tablo 2. 2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı	21
Tablo 2. 3. <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> Bakterileri İçin IMVIC Test Sonuçları	26
Tablo 2. 4. <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> Bakterilerinin Mio Besiyerindeki Tepkimeleri	26
Tablo 2. 5. Kirby Bauer Disk Difüzyon Testinde Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Duyarlılık Sınırları. (EUCAST 2019).....	33
Tablo 2. 6. McFarland Standart Tüpleri Bulanıklık Tablosu.....	34
Tablo 2. 7. Çift Disk Sinerji Testi İçin Kullanılan Antibiyotiklerin Zon Çapları (EUCAST 2019).	36
Tablo 3. 1. <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler	39
Tablo 3. 2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı	40
Tablo 3. 3. Kombne Disk Difüzyon, Çift Disk Sinerji, Üç Boyutlu Test Yöntemi Sonuçlar	41
Tablo 3. 4. Antimikrobiyal Disk İçeriği ve Zon Çapı Sınır Değerleri (EUCAST 2019).	42
Tablo 3. 5. İzole Edilen 125 <i>E. coli</i> ve 25 <i>K. pneumoniae</i> Suşlarının Denenen 11 Antibiyotik İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen mm'lik Zon Çaplarına Göre Orta Duyarlı ve Dirençlilik % Oranları	44
Tablo 3. 6. İzole Edilen 125 <i>E. coli</i> ve 25 <i>K. pneumoniae</i> Suşlarının Denenen 11 Antibiyotik İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen Duyarlılıklarının mm Zon Çapları ve % Oranları	45
Tablo 3. 7. İzole Edilen 125 <i>E. coli</i> İzolatının Disk Difüzyon Yöntemi İle Kullanılan 11 Antibiyotik İçin Dirençlilik Oranları ve Sayıları	46
Tablo 3. 8. İzole Edilen 25 <i>K. pneumoniae</i> İzolatının Disk Difüzyon Yöntemi İle Kullanılan 11 Antibiyotik İçin Dirençlilik Oranları Ve Sayıları	47

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi kadar eski olan enfeksiyon hastalıkları, hastaları tedavi edebilmek ve kontrol altına alabilmek için verilen mücadelede insanlık tarihi kadar eskidir. *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteriler, çevre, insan ve birçok hayvanın normal bağırsak florasında, ünya genelinde, bulunan çok yaygın mikroorganizmalardır. Bu bakteriler insanda tüm bakteriyemilerin yaklaşık üçte birinden, idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE)'nin %70'den ve birçok enfeksiyonu içeren çeşitli hastalıklara neden olur (Pfaller, 2016).

Antibiyotiklere karşı direnç tüm dünyada son yıllarda giderek artan bir problem olmaya başlamıştır (Akova, 2004).

Beta-laktamaz enzimleri antibiyotikleri parçalayarak inaktif hale getirir. Başta *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Günümüzde 470'den fazla TEM, SHV, OXA vb. beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve bu enzimlerin 200 den fazlası genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) özelliğindedir (Bradford, 2001; Bush, 2001).

GSBL'ler penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamlar hidrolizini gerçekleştirir ancak sefamisin ve karbapenemlere etkili değildirler. Aynı zamanda Betalaktaz inhibitörü tarafından inhibe edilebilen enzimlerdir (Khanfar ve ark., 2009).

Bu çalışmada Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatarak ve ayakta takip edilen hastalara ait Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin idrar, apse, kan, abdominal, mayi, periton mayi, endotrakelaspirat (ETA) ve bronkoalvoel lavaj (BAL) kültürlerinden izole edilen GSBL üreten 150 *Enterobacteriaceae* izolatu 125 *E. coli* ve 25 *Klebsiella* spp. suşlarında Genişlemiş Spektrumlu B-laktamazların 3 farklı yöntemle araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. *Escherichia coli* 'nin Genel Özellikleri

Escherichia coli, klinik örneklerden en sık izole edilen *Escherichia* cinsinin en önemli üyesidir. Bu mikroorganizmanın ilişkili olduğu hastalıklar; gastroenterit, idrar yolu enfeksiyonu, menenjit ve sepsis şeklindedir. Ancak bazı serotiplerin (O157 H7 en çok hemorajik kolit ile ilişkilidir) virulansı diğerlerine göre fazladır (Doyle, 1984).

E. coli, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yoğun olarak bulunan normal flora üyesidir. *E. coli* ile konak arasında uyumlu bir ilişki olduğundan normalde hastalığa neden olmaz. Yalnız, farklı bir doku veya organa ya da başka bir konak organizmanın bağırsağına geçmesi ile enfeksiyona sebep olabilir. Bu enfeksiyonlar arasında başlıca gastroenterit olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, septisemi ve pnömoni de sayılabilir (Vila ve ark., 2016).

E. coli, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, 1,1-1,5x2-6 µm, peritratik flegelları ile hareketli, gram negatif basildir. Bazı virulan türleri kamsül oluşturarak katı besiyerin M tipi koloni oluşturur (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Optimum üreme sıcaklığı 37°C olup 7-46°C'ler arasında üreyebilmektedir. 4,4 ile 9 pH aralığında canlılığını sürdürebilmektedir. Genetik olarak *Shigella* ile benzerlik gösterir. *E. coli* başta glukoz ve laktoz ile pek çok şekeri fermentasyon yeteneği ve diğer biyokimyasal testlerle diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayrılmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002).

O (somatik), H (kırpık), K (kapsül) antijenleri bulunmaktadır. O antijenleri, lipopolisakkarit tabakanın polisakkarit kısmında bulunurlar. Isıya dayanıklıdır ve çoğu gram negatif basilin serolojik tiplerinin belirlenmesinde kullanılır. H antijeni, *E. coli*'de olduğu gibi birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde hareketten sorumlu flagella yapısında bulunur. K antijenleri, genellikle kapsülle, daha az sıklıkta ise fimbriyalarla ilişkilidir (Baron ve ark., 2004).

E. coli'nin O, H ve K antijenleri başta olmak üzere diğer yüzey antijenleri *Citrobacter*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* cinsleriyle ortak antijenik benzerlikler vardır. Bu yüzden O antijenleriyle çapraz reaksiyonlar görülebilir. 50 den fazla H antijeni ve yaklaşık 170 O antijeni tanımlanmıştır. *Enterobacteriaceae*'lerin birçok üyesinde olduğu gibi *E. coli* bakterilerinin de fimbriaları bulunmaktadır (Öngen, 2008; Abbott ve ark., 2003).

E. coli'nin gastroenterite sebep olan beş büyük grubu virulans özelliklerine göre sınıflandırılır; enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC) [aynı zamanda shiga toksin-üreten *E. coli* (STEC) ya da vero toksin-üreten *E. coli* (VTEC) olarak isimlendirilir]. Çeşitli mekanizmalar kullanarak hastalığa neden olurlar (Ryan ve Ray, 2004).

Farklı serotip ve patojenik mekanizmalara sahip *E. coli* suşları bağırsak infeksiyonlarına yol açar. Bağırsakta patojen olarak bulunan *E. coli*'nin suşları genellikle olarak beş grupta incelenir.

- 1) Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) : Genellikle tropikal ülkelerde yaşayan bebeklerde ishale sebep olmaktadır.
- 2) Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) : Hijyen koşullarının iyi olmadığı yerlerde görülmektedir. Turistlerde ve çocuklarda ishale sebep olmaktadır.
- 3) Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) : Bütün yaş gruplarında görülebilmektedir. Shigella dizanterisine benzeyen ishal etkenidir.
- 4) Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) : Hafif seyirli sulu dışkıdan, ciddi seyirli olan dışkıda kan bulunan hemorajik kolite kadar çeşitlilik gösterir. Farklı şiddetteki infeksiyonlara neden olur.
- 5) Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) : Gelişmekte olan ülkelerde görülen ishal etkenidir.

ETEC ve EIEC suşları sadece insanda hastalığa neden olmaktadır. Patojenin mekanizmasına göre ishalin görünüşü ve işleyişi değişiklik gösterebilir. Enteropatojenik ve enterotoksijenik suşlar sulu ishale, enteroinvaziv suşlar da kanlı mukuslu ishale, enterohemorajik suşlar kanlı ishale neden olurlar. EIEC, EPEC ve ETEC' ten meydana gelen ishal birkaç günde kendiliğinden geçer. EHEC ise *Shigella* dizanterisine benzer ishal meydana getirdiği için daha ciddi infeksiyondur. Normalde barsakta yaşayan ve patojen olmayan bazı suşlar ile *E. coli*'nin patojen olan suşların bazı özellikleri ortaktır. çoğunluğu indol pozitifdir, laktoz pozitifdir. Bu suşlardan bazıları çoğu peritrik kirpikleriyle hareketlidir ve kapsül oluşturur (Öngen, 2008).

1.1.1. Tedavi, Korunma Ve Kontrol

Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE)'nin %75-90'nın sorumlusu *E. coli*'dir. Tedavide en sık kullanılan antibiyotikler, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ), siprofloksasin, fosfomisin, nitrofurantoin, beta-laktam grubu üyeleridir. Ancak sürekli artan direnç oranları sebebiyle tedavi seçenekleri oldukça azalmaktadır. Amerika enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin ÜSE tedavi rehberinde TMP-SMZ'nin direnç prevalansının %10-20'den düşük olduğu bölgelerde ampirik tedavi için kullanılabilirliği bildirilmektedir. ÜSE tedavisinde yer verilen diğer bir seçenek ilaç ise kinolon grubudur. Ancak yaygın kullanımlarının bakterilerdeki kinolon direnç oranlarını arttırdığını ve normal florayı yok ederek *C. difficile* enfeksiyonuna neden olduğu bilinmektedir. Basit üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde nitrofurantoin veya fosfomisin tedavisi ile oldukça iyi geri dönüşlerin alındığı bildirilmektedir (Panos ve ark., 2006).

Bağırsak florasında bulunan bir bakteri olması nedeniyle *E. coli*'den korunma zordur. Bağırsak hastalıklarından korunmanın en etkin yolu besin ve suların, seçimi, hazırlanması ve tüketimi sırasında hijyenle ilgili gerekli koşulların sağlanmasıdır. *E. coli* enfeksiyonlarına karşı bağışıklanarak korunma yoktur (Erdem, 1999; Brooks ve ark., 2010; Kayser ve ark., 2005).

1.2. *Klebsiella* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Klebsiella cinsi 19. Yüzyılın sonlarında yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten adını almıştır. Hareketsiz, fakültatif anaerop, kapsüllü, 0.7-2.5 x 2.0-5.0 µm boyutlarında gram negatif basillerdir (Bilgehan, 2000).

Klinik örneklerden en sıklıkla izole edilen türü *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*'dir. *Klebsiella*'lar *Enterobacteriaceae* ailesindeki diğer bakteriler gibi oksidaz negatif bakterilerdir. (Bilgehan, 1996).

Laktoza ve diğer şekerlerin çoğunu fermente eder. Sitrat Ornitin dekarboksilaz, Voges-Proskauer (VP), üreaz, lizin dekarboksilaz, malonat pozitif, H₂S, Deoksiribonükleaz (DNase) negatiftir. Katı besiyerinde polisakkarit kapsülü bulunduğu için M tipi mukoid koloniler oluşturur. Polisakkarit kapsülünün 70 e yakın antijenik tipi vardır. *Klebsiella*'larda Kapsül (K) antijenine göre tiplendirme somatik (O) antijen tiplendirilmesinde daha anlamlıdır. *Klebsiella*'larda kapsül en önemli virulans faktörlerdendir. Kapsül; antijenik epitopların ortaya çıkmasını önleyerek kompleman aracılı opsonizasyondan ve lökositlerin fagositozitik aktivitesinden korunmayı sağlar. *K. pneumoniae*'nin üriner sisteme kolonizasyonunda kapsülün rolü olduğu düşünülmektedir. Özellikle konak hücrelere tutunmasını sağlayan tip-1 fimbriya oluştururlar (Abbot 2009; Öngen, 2008).

Katı besiyerlerindeki kolonileri tipik mukoid nitelikte, büyük, sarımtırak gri renkte ve M tipi kolonilerdir ancak uygunsuz koşullarda S ve R tipi kolonilere dönüşebilirler (Bilgehan, 2000; Brisse ve ark., 2006).

En iyi kapsüllenme glikozlu besiyerlerinde görülür. *Klebsiella*'lar ısıya dayanıksızdırlar ve nemli ortamda 55°C'de yarım saatte ölürlere. Ancak kuruluğa karşı dirençlidirler. Oda ısısında haftalarca, 4°C'de ise aylarca saklanabilirler (Tünger ve ark., 2005; Bilgehan, 2000).

K. pneumoniae, insan sağlığı açısından çok önemli olan nozokomiyal, üst solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının oluşmasında rol alan fırsatçı patojendir. Sporadik şekilde gelişirler. *K. pneumoniae*, üriner sistem ve nozokomiyal enfeksiyonlara sıklıkla neden olan bakteriler sıralamasında *E. coli* 'den sonra ikinci sıradadır (Bilgehan, 2000; Jacoby ve ark., 1997; Aladağ ve Durak, 2007).

Fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilebilir. Tipik lobar pnömoni, üst solunum yolu sisteminde çoğalan bakterilerin alt solunum yoluna geçmesiyle oluşur. Hastalık akut şekilde başlar. Akciğerleri tahrip edici ciddi seyirlidir. Antibiyotikleri çok ve sık kullanan hastalarda görülür. Gelişen hastalık; nekrotik, inflamatuvar ve hemorajik yapıdadır, oluşan balgam kanlı ve jölemsi görünümündedir ve plevraya geçme olasılığı yüksektir. Birçok hastada bakteriyemiye de neden olmaktadır. Ayrıca bronkopnömoni, bronşit, abse oluşumu, ampiyem, plörezi gibi klinik tablolara neden olabilir (Clock ve ark., 2013).

Özellikle immün sistemi baskılanmış, alkolik, diabetes mellitus, KOAHlı, kişiler risk altındadır. Bu grup hastalarda ölüm oranı da yüksektir. Pnömoni olgularından sorumlu K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip suşlar sıklıkla izole edilmektedir (Koneman ve ark., 1997).

Klebsiella'nın diğer türleri daha az oranda hastane enfeksiyonundan sorumludur *K. oxytoca* özellikle prematüre bebeklerde ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde, neonatal bakteriyemi ve sepsisli tabloları oluşturmaktadır. *K. rhinoscleromatis* üst solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkilidir. Rinoskleroma, burunun ve üst solunum yolu mukozasında kronik granülomatoz enfeksiyonu oluşturur kronik atrofik rinit “ozena” neden olur. *K. ozaenae*, burun mukozasının ilerleyici atrofisi ile ilişkilidir. Bir çeşit. *K. planticola* ve *K. terrigena* doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar. *K. ornithinolitica* ve *K. planticola*, insan idrar, kan, solunum yolu sekresyonu gibi klinik örneklerden izole edilmiştir (Erdem, 1999; Medscape, 2013).

Bu suşların beta-laktam grubu antibiyotikler ve kinolonlar dışında diğer antibiyotiklere karşıda artan oranda direnç geliştirebilmeleri sorunun boyutunu daha da arttırmaktadır. Burada sorumlu tutulan direnç mekanizmaları arasında en önemlisi GSBL enzimleridir (Pais ve ark. 2002).

1.2.1. Tedavi

K. pneumoniae antibiyotiklere çok dirençli bir bakteridir. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler, özellikle hastane kaynaklı izole edilen suşlarında sıktır ve bunun sonucu gentamisin, tobramisin, hatta amikasinine yüksek oranda direnç gelişimi gözlenir. beta-laktam grubu antibiyotikler ile karbapenemler ve kinolonlara dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında ciddi tedavi sorunları oluşturabilmektedir. Burada sorumlu tutulan direnç mekanizmaları arasında en önemlisi GSBL enzimleridir (Pais ve ark., 2002).

Antibiyotikler, bakterilerin metabolizmasını etkileyerek hastalık oluşturma yeteneklerini durduran maddelerdir. Antibiyotikler bakteriler üzerinde bakterisid veya bakteriyostatik etki gösterirler. Bakteriyostatik etki bakterinin gelişmesini veya üremesini durdururken, bakterisid etki bakteriyi öldürerek etkinlik gösterir (Kayaalp, 1998).

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre farklı gruplara ayrılmaktadır (Forbes ve Sahm, 2003).

1. Hücre duvar sentezi üzerinde etkili olanlar: Beta laktamlar, karbapenemler, glikopeptidler, basitrasin,
2. Hücre zarının yapısını etkileyenler ve fonksiyonunu bozanlar: Polimiksinler, azoller, daptomisin
3. Nükleik asit sentezini veya fonksiyonunu bozanlar: Kinolonlar, sülfonamidler ve trimetoprim, rifampisin
4. Protein sentezini inhibe edenler: Aminoglikozitler, tetrasiklinler, makrolidler, ketolidler
5. Ara metabolitlerin sentezini etkileyenler: Sülfonamidler, nitrofurantoin

Antibiyotikler en çok kullanılan ilaçlardır. Antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı sonucunda dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmaktadır (Töreci, 2003; Akova, 2008). Yeni bir antibiyotığın kullanıma girmesinden sonra dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile antibiyotiklerin etkinlikleride farklılık gözlenmektedir.. Sonuç olarak etkinlikleri düzenli olarak izlenmelidir. (Yao, 2007).

1.3. Direnç

Mikroorganizmaların antimikrobiyal bir etkenin üremesini inhibe eden veya öldüren etkisine karşı koyabilme yeteneğidir.

Belirli bir mikroorganizma için bir antibiyotığın minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI), veya “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST)’da belirlenen standart MİK değerinden yüksek çıkmasına antimikrobiyal direnç olarak adlandırılır. Yani in vitro ortamda yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucu ilacın kullanıldığı dozda hasta tedavi edilemez. (Gülay, 1999; Yüce, 2001; Winn,2006).

1.3.1. Doğal Direnç

Antibiyotiğin, mikroorganizmada etki gösterecek substrat veya enzimin yokluğunda etkinlik gösterememesine denir (Çiftçi ve Aksoy, 2019).

Mikroorganizmada ilacın hedefi olan yapının olmaması veya ilacın yapısal özelliği nedeniyle hedefine ulaşamamasıdır (Gülay, 1999; Yüce, 2001; Winn,2006).

Bu direnç genellikle biyokimyasal ya da yapısal özelliklerine bağlıdır. Örneğin; sefolosporin gurubu antibiyotiklerin hedefi bakterinin hücre duvarı sentezinin inhibisyonudur, hücre duvarı olmayan bakteriler(üroplazma, mikoplazma vb.) üzerinde etkili değildir (Çiftçi ve Aksoy, 2019).

1.3.2. Kazanılmış Direnç

Doğal olarak antibiyotiklere duyarlı olan bakterilerin çeşitli yollarla antibiyotiklerden etkilenmemelerine denir. Bu direnç mekanizmaları genellikle biyokimyasal ve genetik olarak kazanılmaktadır. Biyokimyasal mekanizmalar 4 ana bölümde incelenmektedir. Bu dört ana bölüm içerisinde çok farklı mekanizmalar bulunmaktadır Bir bakteriyel suş, direnç mekanizmalarından biri ile direnç kazanabileceği gibi, birden çok mekanizmayla da direnç geliştirebilir. Kazanılan direnç antibiyotiğin doğasına, , bakteri türüne, hedef bölgeye, transpozon ve direnç plazmidinin varlığına ya da kromozol mutasyonun olup olamamasına göre değişir (Çiftçi ve Aksoy, 2019).

Kazanılmış direncin ortaya çıkmasından farklı mekanizmalar sorumludur. Bu direnci şu şekilde gruplandırabiliriz.(Gülay, 1999; Yüce, 2001; Winn,2006).

- 1) İlacın hedefine ulaşamaması (aminoglikozid)
- 2) İlacın bakteri hücreesindeki hedefinin değiştirilmesi(vankomisin direnci vb.)
- 3) İlacın hedefinin dışında yeni bir metabolik yolun kullanımı (penisilinler)
- 4) İlaç etkinliğini gideren enzimlerin üretimi, (karbapenemler)

Üç veya daha çok antimikrobik (gram negatiflerde sefotaksim, levofloksosin, meropenem, tikarsilin ya da amikasin) grubuna dirençli olan mikroorganizmalar ‘multidrug resistant’ olarak adlandırılırlar.

1.4. Beta Laktam Antibiyotikler

Beta laktam grubu antibiyotiklerin, Enterobacteriaceae ailesinde üyelerinin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir yeri vardır (Topçu, 2008). Beta-laktam grubu antibiyotikler etkilerini, hücre duvar sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe ederek gösterirler (Gülay, 2004). Bakterisid etkili ve toksisiteyi düşük antibiyotiklerdir. Beta-laktam antibiyotikler 5 grupta incelenmektedir (Leblebicioğlu ve ark., 2008).

1.4.1. Kromozomal Beta Laktamazlı Antibiyotikler

Birçok gram negatif bakterilerde kromozom kontrolünde beta laktamazlar sentezlenir. AmpC beta laktamazlar olarak tanımlanan enzimler bunlardan en önemli olanıdır. Bu enzimlerin sefalosporinleri hidroliz etmesi penisilinlerden daha hızlıdır ve Klavulanik asit ve beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedir. Normal şartlarda reseptör mekanizma aracılığıyla enzim düşük düzeyde sentezlenirken ortama sefalosporin eklendiğinde de enzim üretiminde artış olabilmektedir. İndükleyici ortamdan uzaklaştığı zaman enzim sentezi normale dönmektedir. Üçüncü kuşak sefalosporinler zayıf şekilde kromozomal beta laktamazları indüklerler. Dolayısıyla indüklenebilir beta laktamaz bulunduran gram negatif bakteriler bu antibiyotiklerle karşılaştıkları zaman enzim sentezini arttıramadıklarından dolayı bu antibiyotikler tarafından öldürülürler. Çok miktarda beta laktamaz salgılayan bakteri grubundakiler bu antibiyotikler tarafından öldürülemezler. Bu antibiyotiklere duyarlı olan bakteriler ölürken sadece dirençli olan bakteriler kalır. Bu sebeple enfeksiyonun dirençli hale gelmesine neden olurlar (Çolak, 2011).

1.4.2. Plazmid aracılı beta laktamazlar

Bush sınıflandırmasında grup 2b’de yer alan ‘Geniş Spektrumlu Beta Laktamazlar’ plazmid kontrolünde bulunan enzimlerin çoğunu meydana getirmektedir. Bunlar arasında genellikle rastlanan enzimler TEM-1, TEM-2, SHV-1 dir. Bunlar ampisilin, sefalotin, tikarsiline direnç oluşturular. Yeni sefalosporinler, monobaktamlara karşı etkisizdirler ve klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. TEM ve SHV kökenli GSBL’ler kolaylıkla yayılabildiklerinden dolayı hastane enfeksiyonlarında önemli bir sorun olmaktadır. (Çolak, 2011).

1.5. Beta Laktamaz Enzimleri

Beta laktam grubu antibiyotikleri peptidoglikan tabakada hedeflenen bölgeye bağlanmadan, beta laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayan enzimlerdir (Kfoury ve Araj, 2003).

Spratt, ilk kez 1975’te penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) beta laktam antibiyotiklerin hedefinde olduğunu tespit etmiştir. PBP’ ler bakteri sitoplazmik membranında bulunan, peptidoglikan sentezinde yer alan karboksipeptidaz, transpeptidaz veya glikozil transferaz enzimleridir. Beta-laktam antibiyotikler bu enzimlere bağlanarak, peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve bakteri üremesini durdurular (Malouin ve Bryan, 1986).

Kromozom, plazmid veya transpozonlarla direnç genleri ile kodlanmaktadır. Genellikle sınıflandırılmaları: Ambler sınıflandırması ve Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırma sistemi AmpC beta laktamazları Ambler klasifikasyonunda grup C (Bush-Jacoby-Medeiros grup1)’de yer alan, çoğu Gram negatif bakterilerde farklı oranlarda salgılanmaktadır (Rice ve ark., 2003).

Ortamda indükleyici antibiyotik yokluğunda beta laktamaz enzimleri düşük düzeyde üretilmektedir. Ancak indükleyici bir beta-laktam antibiyotiği varlığında; beta laktamaz üretimi geçici olarak artmaktadır. Farklı antibiyotiklerin AmpC indükleme yeteneği farklılık gösterir. Örneğin imipenem ve sefoksitin güçlü indükleyici iken üçüncü kuşak sefalosporinler AmpC beta-laktamazları için zayıf indükleyicidir (Livermore, 1995; Gülay, 2005).

Sefalosporinler arasında, sefepim özellikle AmpC beta-laktamazlara karşı en iyi stabilite gösteren bir ajandır. (Livermore, 1995; Gülay, 2005; Pfaller ve Jones, 2002).

Penisilinaz ilk kez 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından keşfedilmiştir. Günümüzde 400'e yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır ve beta laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu hale getirmiştir. İlk kez 1973 yılında Sykes ve Richmand tarafından beta-laktamazlar sınıflandırılmışlardır. Daha sonra 1976 yılında Sykes ve Matthew tarafından tekrar sınıflandırılmıştır (Bradford, 2001; Bush, 1989; Gür, 1996).

En çok kullanılan sınıflandırma ise Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırılmalarıdır. Ambler, 1980 yılında Beta-laktamazları moleküler yapıları incelendiğinde 4 kategori altında toplanmıştır.

Sınıf A, Sınıf B, Sınıf C, Sınıf D sınıfları. Bush ve arkadaşları, 1995 yılında substrat özgüllüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığının temel olarak biyokimyasal özelliklerine göre fenotipik sınıflandırma ile tüm enzimleri 4 gruba ayırmışlardır. bu grupların genel özellikleri aşağıdaki tablo 1.1.'de görülmektedir (Bush, 1995).

Tablo 1. 1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması (Bush ve ark., 1995).

Bush Jacoby Medeiros	Ambler	Tercih Edilen Substrat	Klavulonik Asit Reaksiyonu	Özellikler
1	C	Sefalosporinler	–	Gram negatif bakterilerde bulunan çoğunlukla kromozomal, bazen plazmid kaynaklı AmpC enzimleri
2a	A	Penisilinler	+	Stafilokok ve enterokoklara ait penisilinazlar
2b	A	Sefalosporinler penisilinler	+	Gram negatif bakterilerde bulunan geniş spektrumlu beta laktamazlar TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler Sefalosporinler Monobaktamlar	+	GSBL: Tem-3
2br	A	Penisilinler	+/-	İnhibitöre dirençli TEM beta laktamazlar
2c	A	Penisilinler	+	
2d	D	Penisilinler kloksasilin	+/-	Kloksasilini hidrolize eden enzimler OXA-1
2e	A	Sefalosporinler	+	
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	Karbapenemleri hidrolize eden enzimler
3	B	Birçok beta laktam, Karbapenemler	-	Monobaktamlar dışındaki beta laktamazları hidrolize eden metallo beta laktamazlar
4	Belirtilmemiş	Penisilinler	-	Diğer gruplara dahil edilmeyen beta laktamazlar.

1.5.1. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)

İlk kez 1930'lu yılların sonlarına doğru Abraham ve Chain tarafından bir *E. coli* suşunda penisilini parçalayabilen bir penisilinaz keşfedilmiştir. GSBL, oksiminio sefalosporinleri hidrolize eden, klavulonik asit ile inhibe olabilen enzimlerdir (Bradford, 2001).

Kirby, 1944 yılında, *S.aureus* suşlarından benzer özellikte bir enzimin varlığını kanıtlamıştır. Penisilinin, hasta tedavisinde kullanımasını izleyen 20-25 yıl boyunca betalaktamazların sayısı ve çeşitleri oldukça kısıtlı kalmıştır. Ancak, 1978-1980 yıllarında, yeni beta-laktam antibiyotiklerin (sefamisinler, karbapenemler, monobaktamlar) kullanılması ile beta-laktamaz çeşitliliğinin de arttığı gözlenmiştir. Beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı, 1995-2000 yıllarında, grup 1, 2be, 2br, 2d ve 3'deki enzim sayılarında yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Penisilin G'yi hidrolizleyen, beta-laktamaz (penisilinaz) plazmid aracılı yayılım göstermekteydi. Gram negatif bakterilerde 1963' yılından itibaren geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) gözlenmiştir. Bu plazmid aracılı kodlanan enzimler temosilin dışındaki penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinler inaktive etmişlerdir. Yıllar içerisinde, gram negatif bakteriler beta-laktamazlarını modifiye (enzimin aktif bölgesinde bir veya birkaç aminoasidi değiştirerek) ederek, etki spektrumlarını genişletmiştir. Bunun sonucunda, ilk GSBL pozitif suş, *K. pneumoniae* olarak 1983'de Almanya'dan bildirilmiştir (Gülay, 2004; Bradford, 2001).

Birçok bakteri türünün, özellikle de *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere, en önemli direnç mekanizmalarında biri; beta laktamaz enzimi üretimidir. Günümüze kadar 400 civarında beta laktamaz enzimi ortaya konulmuştur ve bunların 150'ye yakını genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardan oluşmaktadır. GSBL'ler, Gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlara karşı dirençten sorumlu enzimlerdir. GSBL üretimi ve bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılması son yıllarda ciddi problemlere sebep olmaktadır. GSBL üreten kökenlerle enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerin kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır. (Paterson, 2005).

Son yıllarda, GSBL'lerin sayıları hızla artış göstermektedir. Yapısal özellikler ve evrimsel gelişimleri açısından GSBL'ler 9 kategoride sınıflandırılmaktadırlar. Bu gruplar TEM, SHV,

CTX-M, VEB, PER, TLA, GES/IBC, BES ve OXA'dır. Örneğin: Bu enzimlerin çoğu aktif bölgesinde bir serin aminoasidi içerir ve Ambler sınıflamasında A sınıfındadır. Beta-laktamazların biyokimyasal özelliklerinin öncelikli olarak yer aldığı Bush-Jacoby Medeiros sınıflamasına göre ise genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar 2be, 2e ve 2d gibi alt gruplarında yer alır. GSBL' ler, beta laktamaz inhibitörlerine (klavulonik asit, tazobaktam ve sulbaktam) duyarlıdırlar. Sefamisin ve karbapenemleri karşı etkili değildirler (Gülay, 2001; Gür, 2004; Ambler, 1980).

GSBL saptama ve doğrulama testlerinde; indikatör bir sefalosporin (genellikle sefoksitin) ile bir β -laktamaz inhibitörünün (genellikle klavulanik asit) arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanır (Özsoy, 2001; Livermore, 2001).

- Çift disk sinerji testi,
- Kombine disk difüzyon,
- Mikrodilüsyon yöntemi
- Üç boyutlu test
- E-test,
- Otomatize sistemler ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (Bradford, 2001).

GSBL enzimleri sentezleyen bakterilerde bulunan plazmidler aynı zamanda pek çok direnç geninide taşımaktadır. Bunun sonucunda; GSBL üreten bakterilerde aminoglikozidler, kinolon, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfometaksazol direnci de bulunabilmektedir (Akova, 2004).

1.6. GSBL Saptama Yöntemleri

Duyarlılık testlerinin amacı in vitro antibiyotiklere olan direncin belirlenmesidir. GSBL üreten mikroorganizmalar klinik açıdan çok önemlidir. Dirençli mikroorganizmalar yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır. (Bal, 1997).

1.6.1. Tarama testleri

Üçüncü kuşak sefalosporinlere veya aztreonama direnç veya azalmış duyarlılık test edilmektedir. Tarama testlerinde dilüsyon veya disk difüzyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, aztreonam veya seftazidim kullanılmaktadır. GSBL pozitif suşlarda, inhibisyon zonu daralması veya MİK değerlerinin belirli sınırların üzerindedir. GSBL'lerin substrat tercihleri farklı olduğu için antibiyogram testlerinde farklı geniş spektrumlu beta laktamların kullanılması tarama testinin duyarlılığını artırır. (Gülay, 2004; CLSI, 2006).

1.6.2. Doğrulama testleri

GSBL varlığını doğrulamak için bu enzimlerin klavulanik asit ile inhibisyonundan yararlanılmaktadır. Disk difüzyonu testi için 10 µg lık klavulanik asit tek başına ve 30 µg lık sefotaksim ve seftazidim diskleri ile kullanılabilir. Doğrulama testlerinin prensibi, indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam ve klavulanik asit arasındaki sinerjinin gösterilmesi ilkesine dayanır (CLSI, 2006).

1.6.2.1. Çift Disk Sinerji Testi

Disk difüzyon yöntemine dayanır. Bakteri süspansiyonu 0,5 Mc Farland standardı yoğunluğunda hazırlanır ve Mueller Hinton agar plağına ekim yapılır. Plağın ortasına amoksisilin-klavulonik asit diski (AMC 10+20µg) yerleştirilir. Antibiyotik diskleri arasındaki uzaklık 20–25 mm olacak şekilde aztreonam (AZT 30µg), sefotaksim (CTX 30µg), seftazidim (CAZ 30µg) diskleri koyulur. 35-37 °C'de 18–24 saat etüvde inkübasyona bırakılır. Animikrobiyal ajanlara ait inhibisyon zonlarının klavulanik asit yönünde genişlemesi veya diskler arasında kalan bölgede inhibisyon alanının gözlenmesi ile GSBL pozitif (+) olarak yorumlanır (Bradford, 2011; CLSI, 2011) (Şekil 2.1.) (Gülay, 2004).

GSBL üreten suşlarda Amoksisilin-klavulonikasit diski etrafına yerleştirilen seftazidim, sefepim, sefoksitin, aztreonam inhibisyon zon çaplarının genişlemesi (Gülay, 2004).

1.6.2.2. Kombine disk difüzyon

McFarland 0.5 standart yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller hinton plağına klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri dikkatlice yerleştirilir. Bir gece 37°C’de inkübasyonun ardından, inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafında yer alan inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olan izolatlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (Şekil 2.2)(Gülay, 2004).

Aynı besiyeri üzerine klavulanik asit içeren ve içermeyen sefalosporin diskleri yerleştirilir. İnhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. İnhibitör içeren ve içermeyen diskler arasındaki fark 5 mm’ye eşit ya da büyük ise GSBL pozitif demektir (NCCLS, 2003; Gür, 2004).

1.6.2.3. Üç boyutlu test

Mikroorganizma agar yüzeyine ekilir daha sonra agar yüzeyinde delik açılır. Yarığın içi bakterinin de olduğu sıvı besiyeri ile doldurulur. Antibiyotik diskleri yarıktan 3 mm uzakta olacak şekilde dizilir. Yarığa bakan taraftaki inhibisyon zonunda bozulma, daralma olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Rutin olarak yapılması zor bir testtir (Gülay, 2004).

1.6.2.4. E-Test

Sefotaksim, seftazidim, sefotaksim+klavulanik asit ve seftazidim+klavulanik asit içeren E test stripleri kullanılarak yapılmaktadır. Strip petriye yerleştirilir inkübasyon sonucunda elips şeklinde zon oluşur. Bu zonun stribi kestiği noktada okunan rakam suş için antibiyotik MİK değerini verir. MİK değerlerinin birbirleriyle oranların 8 kat ve daha fazla çıkması GSBL varlığını gösterir.

1.6.2.5. Diğer testler

İnhibitörlü agar kullanımı

Mueller-Hinton agar içine klavulanik asit eklenir. Genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin antibiyotik içeren ve içermeyen Mueller-Hinton agardaki zon çapları karşılaştırılır. Rutin olarak uygulanması zordur. Klinik izolatlarda GSBL varlığını saptama amacıyla kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1.2’de gösterilmiştir (Ceylan, 2015).

Tablo 1. 2. GSBL Varlığını Saptamak İçin Kullanılan Yöntemlerin Üstünlüklerinin Karşılaştırılması

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
CLSI GSBL tarama testleri	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL’ler her zaman dirençli olmayabilir.
Çift disk sinerji	Uygulama ve yorum kolaylığı	Diskler arası mesafeler halen standart değil.
Üç boyutlu test	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL’ye özgül değildir.
E test	Uygulama kolaylığı	Maliyet yüksek.
Otomatize sistemler	Uygulama kolaylığı	Karbapenem dirençli
Oligotiplendirme	Özgül TEM varyantları tespit edilebilir.	Yeni varyantlar tespit edilememektedir
PCR-RFLP	Uygulama kolay, spesifik nükleotid değişiklikleri saptanabilir.	Spesifik nükleotid değişiminin saptanmalıdır.
Nükleotid dizi analizi	Altın standart. Yeni enzimler saptanabilir.	Uygulama zor, maliyet yüksek

1.6.3. Biyokimyasal ve Moleküler yöntemler

1.6.3.1. İzoelektrik odaklama

Bakteri ekstratlarının poliakrilamid jelde yürütülmesi temeline dayanır. Elektroforez sonunda β laktamaz enzimleri izoelektrik noktalarında (pI) odaklanır ve nitrosefin kullanılarak görünür hale getirilir. İzoelektrik odaklama bakterinin kaç adet enzim salgıladığını ve/veya enzimlerin ailesi hakkında fikir verir. Fakat bu yöntem çok sayıda enzimi birbirinden ayırmada yetersiz kalmaktadır (Bradford, 2001; Livermore, 1995).

Bakteri ekstratlarının poliakrilamid jelde yürütülmesi temeline dayanır. İzoelektrik odaklama bakterinin kaç adet enzim salgıladığını ve/veya enzimlerin içinde bulunduğu grubu hakkında bilgi verir. Bu yöntemin dezavantajı ise çok sayıda enzimi birbirinden ayırmada yetersiz oluşudur (Göker, 2007; Livermore, 1995; Bradford, 2001).

1.6.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Özellikle gruba spesifik primerlerle CTX-M tipi GSBL'lerin saptanmasında yararlıdır (Pitout ve ark., 2004).

1.6.3.3. Gen dizi analizi

Spesifik primerlerle (TEM, SHV, OXA vb) PZR sonrası elde edilen ürünün gen dizisi çıkarılır çıkarılan bu diziler gen bankasında kayıtlı olan dizilerle karşılaştırılır. Sonuçta dizinin bilinen bir enzimi yoksa yeni bir GSBL mi kodladığı anlaşılmaktadır (Moland ve ark, 2008; Drieux ve ark., 2008).

1.6.3.4. DNA Dizi Analizi

Bu yöntemle farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilir. GSBL tanımlanmasında "altın standart" kabul edilir.⁸⁰ Spesifik primerlerle PZR sonrası elde edilen ürünün gen dizisi çıkarılır ve bu dizi Gen Bankası'nda kayıtlı bulunan dizilerle karşılaştırılarak, dizinin bilinen bir enzimi mi, yoksa yeni bir GSBL enziminimi kodladığı ortaya çıkarılır. (Drieux ve ark., 2008; Fluit ve ark.,2001; Moland ve ark., 2008).

1.6.3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism)

Bu yöntemde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucunda elde edilen ürünler restriksiyon enzimleriyle kesilir ve elde edilen fragmanlar elektroforezle birbirinden ayrılır (Arlet ve ark., 1995)

1.6.3.6. Oligotipleme

Nokta mutasyonlarını saptayan proplarla yapılır (Mabilat ve ark., 1990).

2.7. Beta Laktamaz İnhibitörleri

Klinikte çeşitli beta-laktam antibiyotiklerle kombine halde kullanılan (klavulonik asit ve sulbaktan, tazobaktam) beta-laktamaz inhibitörü mevcuttur.

Tek başlarına kullanıldıklarında antibakteriyel etkinlikleri yoktur. Etkilerini beta-laktamazın aktif bölgesine bağlanarak gösterirler. Bağlanma sonucu enzim tarafından inhibitör parçalanır ve “intihar inhibitörleri” olarak adlandırılır. Kimyasal reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan reaktif gruplar (enzim ve inhibitör) arasında kovalen bir bağ oluşur. Tepkime sonucu yapı geri dönüşümsüz (irreversible) olup, bu sayede beta-laktamaz inaktif hale gelir (Bush ve ark.,

1990).

İnhibitörler tüm beta-laktamazlar üzerine aynı etkiyi göstermezler. Tablo 1.3.'de beta-laktamaz inhibitörlerinin etki spektrumları görülmektedir.

Tablo 1. 3. Beta-laktamaz İnhibitörlerinin Etki Spektrumları.

Beta-laktamaz tipi				
İnhibitör	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Klavulanik asid	-	++	-	-
Sulbaktam	+/-	+	-	-
Tazobaktam	+/-	++	-	-

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonunun etkili olmasında dört faktör etkilidir (Livermore, 1987).

- İnhibitörün enzim olan afinitesi
- Beta-laktamazın kombinasyon içindeki beta-laktama afinitesi
- Bakterinin salgıladığı beta-laktamazın miktarı
- Gram negatif bakteri dış membranının inhibitöre permeabilitesi

(a) ve (d)'deki artış (b) ve (c)'deki azalış beta-laktam/inhibitör kombinasyonunu o bakteri türünde karşı etkinliğini artırır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

Tablo 2. 1. *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler

Örnek Türü					
İzolat	İdrar	Yara	Kan	Diğer	Toplam
<i>E. coli</i> (125)	90	20	2	13	125
<i>K. pneumoniae</i> (25)	14	3	5	3	25
Toplam (150)	104	23	7	16	150

Tablo 2. 2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

İzolat	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Yoğun Bakım	27	21,60%	3	12,00%	30	20,00%
Poliklinik	48	38,40%	15	60,00%	63	42,00%
Klinik	50	40,00%	7	28,00%	57	38,00%
Toplam	125	100,00%	25	100,00%	150	100,00%

15.10.2015 -15.10.2018 tarihleri arasında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatarak ve ayakta takip edilen hastalara ait Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin idrar, apse, kan, abdominal, mayi, periton mayi, endotrakel aspirat (ETA) ve bronkoalvoeler lavaj (BAL) kültürlerinden izole edilen 150 *Enterobacteriaceae* izolatu 125 *E. coli* 25 *K. pneumoniae* çalışmaya dahil edildi 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* olan toplam 150 idrar izolatu ile çalışılmıştır.

İzolatlar antibiyotik duyarlılık sonucuna göre GSBL oluşturma ihtimali olanlar arasından seçilmiştir. Suşlar tek koloni pasajı yapılarak kanlı agarda üredikten sonra %20 gliserol içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine inoküle edilerek -80°C’de saklandı. Ependorf içerisinden swap/öze ile alınan materyal zenginleştirilmiş besiyerine alındı ve numaralandırıldı (EC, KP). 35-37°C’de 24 saat aerob Etüv de inkübe edildi. Daha sonra elde edilen izolatlar EMB Agara ekimi yapılarak inkübe edildi ve izolatlar çalışmamızda kullanılmak üzere (Kombine Disk Yöntemi, Çift Disk Sinerji Yöntemi, Üç Boyutlu Test Yöntemi) Müller-Hilton Agara ekimi yapıldı. Plaklar inkübe edildi ve sonuçlar gözlemlendi. İzolatlar sınıflandırılarak kayıt edildi ve Tablo 2.1. ve 2.2.’de gösterildi.

Klinik örneklerden izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin cins ve tür adının tanımlanması için aşağıdaki testler yapılmıştır.

2.2. Örneklerin Analize Hazırlanmasında Kullanılan Besiyerleri

2.2.1. Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437)

İn vitro yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, agar difüzyon testi ile klinik olarak önem arz eden patojenlerin, antibiyotik ve sulfonamitlere karşı duyarlılığını belirlemek için kullanılan katı besiyeridir.

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Meat infusion	2,0
Casein hydrolysate	17,5
Nişasta	1,5
Agar-agar	13,0

2.2.2.EMB Agar (Merck 1.01347)

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Peptonlar	10,0
K ₂ HPO ₄	2,0
Lactoz	5,0
Sükroz	5,0
Eosin Y sarımsı	0,4
Metilen Mavisi	0,07
Agar agar	13,5

Dehidre besiyeri 36,0 g/L olacak şekilde damıtılmış su içinde ısıtılarak eritilir. Otoklavda sterilize edilir ve 45-50 °C'ye kadar soğutularak steril petri kaplarına 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış olan besiyeri berrak ve kırmızımsı-kahve, menekşe-kahverenginde olup, 25 °C'de pH'ı 7,1±0,2'dir.

2.2.3. Nutrient Agar (NA) Besiyeri (Merck 1.05450)

In vitro olarak yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde genel katı besiyeri olarak kullanılır.

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Etten elde edilen pepton	5,0
Et özü	3,0
Agar-agar	12,0

Dehidre besiyeri 20,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50 °C'ye kadar soğutulur ve steril Petri kaplarına 12,5 mL olacak şekilde dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C'de pH'ı 7,0±0,2'dir. (Link, 3).

2.2.4. Üre Agar Besiyeri (Merck 1.08492)

In vitro olarak standart mikrobiyolojik analizlerde üre testi ile mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan katı besiyeridir.

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Etten elde edilen pepton	1,0
D(+) Glikoz	1,0
NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Fenol Kırmızısı	0,01
Agar-agar	12,0

Üre, üreaz enzimi ile karbondioksit ve amonyaka parçalanır. Oluşan amonyak pH'ı yükseltir ve sonuçta pH indikatörü aracılığı ile renk kırmızıdan sarı-pembeye döner. Besiyerinin yüzeyine yoğun bir şekilde sürme yapılır. İnkübasyon süresi 35 °C'de 5-48 saattir. Enzim aktivitesine ve aşılama yoğunluğuna bağlı olarak pozitif sonuçlar 5 saat sonunda alınabilir. Bu test için 1 tüpün aşılama kontrol olarak bırakılması, 1 tüpün *Proteus spp* ile (pozitif kontrol) ve 1 tüpün de *E. coli* (negatif kontrol) ile aşılması önerilir (Link, 4).

2.3. *E. coli* ve *Klebsiella spp.* İdentifikasyonunda Kullanılan Testler ve Besiyerleri

2.3.1. Gram Boyama

Mikrobiyolojide en sık kullanılan boyama yöntemidir ve mikroorganizmaların % 95 den fazlası gram ile boyana bilmektedir. Mikroorganizmaların sınıflandırma ve tanımlanmasında ipucu vermektedir. Numune temiz bir lamın üzerine yayılır ve kurutulur. Daha sonra boyama işlemine geçilir. İlk olarak bir kimyasa veya ateş yardımı ile numune lam üzerine tespit edilir. Sonra ilk boya olan Kristal violet (veya metil violet) solusyonu ile 1-2 dakika boyanır ve boya işlem sonunda boya dökülür ve su ile lam yıkanır. 2. aşamada ise lugol solusyonu konarak 1-2 dakika beklenir ve Lugol solusyonu dökülür, ardından yıkama işlemi gerçekleştirilir. 3. Aşamada dekolarizasyon aşamasıdır Alkol ve aseton 15-30 saniye lam üzerinde bekletilir ve yıkama işlemi uygulanır. 4. Ve son aşamada Safranin (veya eosin, sulu fuchsin) ile 30-60 saniye boyanır ve yıkama işlemi gerçekleştirilir. Kurutma kâğıdında veya havada kurutulur. Mikroskopta Mavi-Mor görülen mikroorganizmalar gram pozitif, pembe kırmızı görülenler ise gram negatif olarak değerlendirilirler.

Tablo 2. 3. *E. coli* ve *K. pneumoniae* Bakterileri İçin IMVIC Test Sonuçları

	İndol	Metil red	Voges- Proskauer	Sitrat
<i>E. coli</i>	+	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	+

Tablo 2. 4. *E. coli* ve *K. pneumoniae* Bakterilerinin Mio Besiyerindeki Tepkimeleri

	Hareket	Ornitin dekarboksilaz
<i>E. coli</i>	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-

2.3.2 İndol Testi

İndol testi, mikroorganizmaların triptofanı (aminoasit) ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Mikroorganizmalar triptofan bulunan sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekilerek 37 °C de yaklaşık 2 gün inkubasyona bırakılır. Kültürlerin üzerine 0.5 ml Kovak's indol ayırıcı ilave edilir ve iyice karıştırılır. Tüplerin üst tarafında 1-2 dakika içinde kırmızı halkanın görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Sarımsı halka görülmesi indolun oluşmadığını gösterir ve negatif olarak değerlendirilir (Link, 5).

2.3.3. Sitrat Testi

Test yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su ile biraz sulandırıldıktan sonra Simmons Sitrat besiyerlerine ekim işlemi yapılır. Tüpler 2-7 gün 37 °C'de inkubasyonda bırakılır. İnkubasyon süresi sonunda Simmons sitrat besiyerinde, hiçbir üremenin olmaması ve ortamın

yeşil rengini koruması negatif reaksiyon olarak değerlendirilirken, ekim hattı boyunca üreme meydana gelmesi ile birlikte koyu mavi rengin oluşması da pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.(Link,6).

2.3.4. Metil Red Testi (MR)

Metil red testi, glikozun fermentatif olarak metabolize olması sonucu besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH değerinin düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Test, mikroorganizma cinslerinin *E. coli*, *Enterobacter* ve türlerinin ayrılmasında kullanılır. Metil kırmızısı solusyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir.

Üremiş olan kültürlerden, besiyerlerine ekim yapılır. Tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılır. Metil kırmızısı solusyonununun besiyeri üzerine 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır. Metil red solusyonu besiyerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı-pembe renkli bir halkanın oluşması pozitif olarak kabul edilirken üst tarafta sarı bir halka görülmesi negatif reaksiyon olarak kabul edilir (Link, 7).

2.3.5. Voges-Proskauer (VP) Testi

Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente ederek, nötral bir ürün olan asetilmetilkarbinol'u meydana getirme yeteneğinin tayininde kullanılır. Bakterilerin identifikasyonunda kullanılır. Glikoz ilk olarak pirüvik asite metabolize olur. Pirüvik asidin ayrışması, bakterilerin türlerine göre aerobik veya anaerobik yolla gerçekleşir. Glikozun fermentasyonu sonucunda acetoin ve bunun bir nötral redüksiyon ürünü olan 2,3-butanediol'da gerçekleşir.

İçinde glikoz bulunan bufferlı besiyerine kültürlerden ekim yapılır. Daha sonra 37°C de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere Voges-Proskauer ayırıcından 1 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutulur. Aralıklı olarak hafifçe çalkalanır. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde acetoin varlığından

dolayı pembe rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edilirken sarı-kahverengi renk oluşması negatif olarak değerlendirilir.

2.3.6. Mio Medium Testi

İzole edilen bakteriler Mio medium besiyerine ekilmiştir. Mio Medium besiyeri ile bakterilerin ornitini kullanıp kullanmadıkları ve hareket özelliklerinin olup olmadığı tayin edilmektedir.

İzole edilen bakteriler üreli agara ekilmiştir ve besiyerleri 37°C de 18- 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreaz aktivitesi *E. coli* için negatif, *K. pneumoniae* için ise pozitif üreaz sonuç vermektedir.

2.3.7. Üreaz Testi

Üreaz testi, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden ürease enzimini saptamak için kullanılır. Bakterilerin cins ve türlerinin tayininde Ürease hidrolizasyon testi yapılır. Ürenin hidrolizasyonu ürease enzimi tarafından katalize edilir. Reaksiyonun sonucunda 2 molekül karbondioksit ve amonyak meydana gelir.

2.3.8. Oksidaz Testi (Bactident Oxidase, Merck)

İn vitro ortamda yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde bakterilerde sitokrom oksidaz testinin gerçekleştirilebilmesi için bir ucunda reaktif bölgesi olan test şeritleridir. Reaktif bölge N-Dimetil-1,4-fenilendiamonyum klorür (0,1 µmol) ve α-naftol (1,0 µmol) bileşimini içerir (Link, 9). 10 saniye içinde pembe renk oluşturan koloniler oksidaz (-), mavi-mor renk oluşturan koloniler oksidaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Koneman ve ark., 1992).

2.3.9. Katalaz Testi (Merck Bactident Katalaz (30 ml) - M111351.0001)

TSA besiyerindeki stok kültürden öze ile alınan koloni kuru bir lam üzerine aktarılır. Üzerine 0,1 mL kadar katalaz ayıracından bir damla damlatılır. Koloni veya bakteri kütlesi üzerinde gaz (oksijen) oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilirken negatif reaksiyonda gaz çıkışı gözlenmez.

2.3.10. Hareket Testi (SIM Medium (Merck 1.05470))

Sulfate, Indole, Motility Medium; Sülfat İndol, Hareket besiyeridir. In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde Enterobacteriaceae üyelerinin tanımlamasında uygulanan sülfür oluşumu, indol üretimi ve hareketlilik testleri için kullanılan besiyeridir.

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Kazein kaynaklı pepton	20,0
Et kaynaklı pepton	6,6
Amonyum demir (II) sitrat	0,2
Sodyum tiyosülfat	0,2
Agar-agar	3,0

Dehidre besiyeri 30,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılıp tam olarak eritilir. Besiyeri henüz sıvı halde iken, tüplere 4'er mL olacak şekilde dağıtılır ve 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkarıldıktan sonra besiyeri dik olarak soğumaya bırakılır ve katılaşması beklenir. Agar miktarının düşük olmasından dolayı yarı katı formdadır. Hazır olan besiyeri berrak, sarımsı-kahve renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir (Mikrobiyoloji.org, 2019).

Kültürden alınan suşlar besiyerinin dip kısmına kadar dik bir şekilde iğne öze ile batırılarak ekilmiştir. 37°C'de 48 saatlik inkübasyonda bekletilir. Sonuçta ekim çizgisi boyunca ters çam ağacı biçiminde görülen koloniler hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.3.11. Simmons Sitrat Agar (Merck 1.02501)

In vitro olarak yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakterilerin tanımlama testlerinden sitrat testi için kullanılır.

<u>Bileşim</u>	<u>Mikt</u>
Amonyum dihidrojen fosfat	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NaCl	5,0
Sodyum Sitrat	2,0
MgSO ₄	0,2
Brom timol mavisi	0,08
Agar-agar	13,0

Dehidre besiyeri, 22,3 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak tam olarak eritilir. Besiyeri sıvı halde iken, standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer mL olacak şekilde dağıtılır ve tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besiyeri henüz sıvı iken tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde dökülerek besiyerinin katılaşması beklenir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renkte olup, 25 °C 'da pH'ı 6,6±0,2'dir.

Besiyerinde bulunan tek karbon kaynağı sitrattır. Bundan dolayı sitratın karbon kaynağı olarak kullanılması halinde besiyerinin pH'ı yükselir ve bu durum pH indikatörü aracılığı ile belirlenir. Genellikle 37 °C'da 48 saat süren inkübasyon süresinden sonra besiyerinin orijinal rengi olan koyu mavi renginin korunmuş olması sitratın kullanılmadığını gösterir. *E. coli*, tipik sitrat negatif bakterilerdir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin yeşile dönüşmesi ise sitratın kullandığının göstergesidir. Enterobacter, *Klebsiella*, tipik sitrat pozitif bakterilerdir (Link, 10).

2.3.12. Metil Red- Voges Proskauer (MR-VP) Broth (Merck 5712)

<u>Bileşimi</u>	<u>Mikt</u>
Pepton (etten)	7_
D(+) Glikoz	5_
Fosfat tamponu	5_

Toz halindeki maddeler 25°C’de, pH 6,9 ± 0,1 koşullarında 1000 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Homojen hale gelen besiyeri deney tüplerine 5’er ml pipetlenerek 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

2.3.13. MR İndikatörü

<u>Bileşimi</u>	<u>Mikt</u>
Metil red	0,2
% 95’lik etil alkol	50
Damıtık su	50

Toz halindeki metil red 50 ml etil alkol içerisinde homojen hale getirildikten sonra çözeltiye 50 ml distile su eklenerek 100 ml’lik indikatör solüsyon hazırlanır.

2.3.14. VP İndikatörü

<u>Bileşimi</u>	<u>Mikt</u>
Alfa naftol (α -naphtol)	5
Etil alkol	100

5 gr α -naphtol 100 ml etil alkol içerisinde homojen hale getirilerek indikatör solüsyon hazırlanır.

2.4. Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi

Antibiyotik duyarlılık testi EUCAST önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi yapılmıştır (EUCAST, 2019)

0,5 Macfarland bulanıklık standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu Steril eküvyon ile Mueller Hinton Agar yüzeyine ekim yapılmıştır. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 35-37 °C’de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan antibiyotik inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Elde edilen zon çapı sonuçları EUCAST da belirtilen zon çapları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. *K. pneumoniae* ve *E. coli* ‘nin antibiyotiklere duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir. bioanalyse firmasından temin edilerek çalışmamızda kullanılan antibiyotikler ve antibiyotik disklerine ait zon çapları Tablo 2.5.’de gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler: Aztreonam (ATM,30 µg;Bioanalyse), Seftazidim (CAZ,30µg;Bioanalyse), Ertapenem (ETP,10µg;Bioanalyse), Siprofloksasin (CIP,5 µg;Bioanalyse), Gentamisin (CN,10µg;Bioanalyse), Amikasin (AK,30 µg;Bioanalyse), Meropenem (MEM,10µg;Bioanalyse), İmipenem (IPM,10µg;Bioanalyse), Fosfomisin (FOS, 200 µg;Bioanalyse), Netilmisin (NET,30µg;Bioanalyse), Piperasilin-Tazobaktam (TZP,100/10 µg;Bioanalyse)

Tablo 2. 5. Kirby Bauer Disk Difüzyon Testinde Kullanılan Antibiyotik Diskleri ve Duyarlılık Sınırları. (EUCAST 2019)

Antibiyotikler	Antibiyotik Konsantrasyonu	Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapı (mm.)*		
		Hassas (S)	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R)
Aztreonam (ATM)	30 µg	≥22	16-21	≤15
Seftazidim (CAZ)	30 µg	≥18	15-17	≤14
Ertapenem (ETP)	10 µg	≥19	16-18	≤15
Siprofloksasin (CIP)	5 µg	≥21	16-20	≤15
Gentamisin (CN)	10 µg	≥15	13-14	≤12
Amikasin (AK)	30µg	≥17	15-16	≤14
Meropenem (MEM)	10µg	≥16	14-15	≤13
İmipenem (IPM)	10µg	≥16	14-15	≤13
Fosfomisin (FOS)	200µg	≥16	13-15	≤12
Netilmisin (NET)	30µg	≥15	13-14	≤12
Piperasilin-Tazobaktam (TZP)	100/10µg	≥21	18-20	≤17

2.4.1. Serum fizyolojik

Bileşimi

Mi

Sodyum klorür

8,7

8,75 gram sodyum klorür tartılarak, 1000ml litre distile su içerisinde çözülüp, 121°C’de 15 dakika otaklavda steril edilmiştir.

2.4.2. Mc Farland bulanıklık

Mc Farland bulanıklığı standartları; test süspansiyonu bulaklılığını Mc Farland standart bulanıklığı ile görsel olarak karşılaştırarak süspansiyon içindeki tahmini bakteri sayısını standardize etmek amacıyla kullanılır.

Tablo 2. 6. McFarland Standart Tüpleri Bulanıklık Tablosu

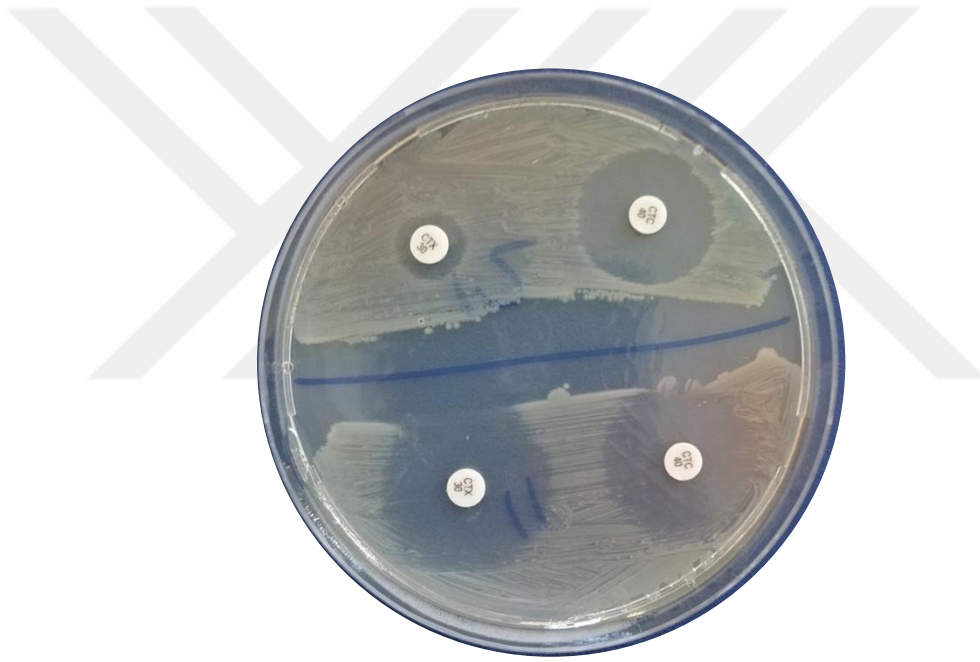
McFarland	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Yaklaşık bakteri sayısı / mL
0.5	0.05	9.95	1.5 x10 ⁸
1	0.10	9.90	3.0 x10 ⁸
2	0.20	9.80	6.0 x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0 x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2 x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5 x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8 x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1 x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4 x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7 x10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0 x10 ⁹

Ancak, metot her mikroorganizma için uygulanamaz, her mikroorganizmanın standart bulanıklık tüplerine göre meydana getirdiği yoğunluktaki miktarları aynı değildir. 0,5 Mc Farland standardında bulanıklık tüpü hazırlamak Tablo 2.6.' de gösterilen oranlar kullanılmaktadır. Bakteri çeşitlerine göre mikroorganizmaların sayısında da değişebilir. (Arda, 2000).

Mc farland solüsyon deney tüpleri 5'er ml hazırlanarak oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.

2.5. Kombine Disk Yöntemi

Kombine disk yönteminde Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirildi. Bir gece boyunca 35°C’de inkübasyona bırakıldı. Klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırıldı. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu İnhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırıldı. Klavulonik asit içeren içeren ve içermeyen diskler arasındaki fark 5 mm’ye eşit ya da büyük ise GSBL pozitif olarak kabul edildi. (Şekil 2.1.)



Şekil 2. 1. Kombine Disk Pozitif ve Negatif Sonuç

2.6. Çift Disk Sinerji Testi

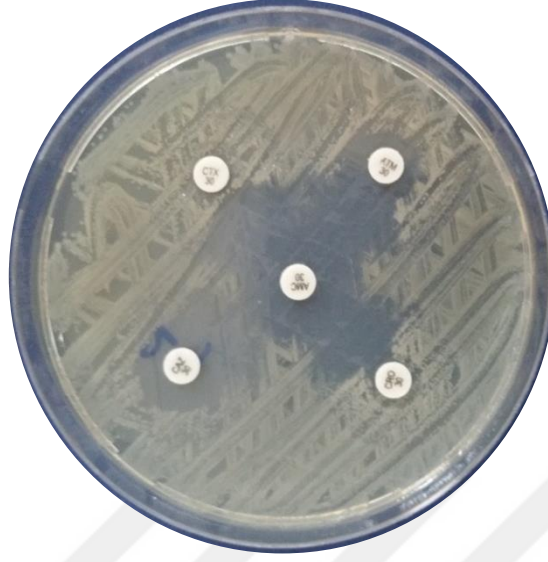
İzole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* türlerinin çift disk sinerji yöntemiyle GSBL varlığı araştırılmıştır (Akçam ve ark.2004). Mueller hintona ekilerek 37 °C’de 24-18 saat inkübe edilmiş olan kültürlerden 2-3 koloni alınarak, 0,5 Macfarland bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde serum fizyolojik içinde süspanse edilmiştir. Steril eküvyon çubuk ile süspansiyondan

alınarak Mueller Hinton Agar yüzeyine ekim işlemi yapılmıştır. Besiyeri yüzeyine antibiyotik diskleri; merkezde amoksisilin klavulonik asit olacak şekilde yerleştirilir ve sonra merkeze uzaklıkları 25 mm ve 20 mm olacak şekilde aztreonam (ATM-30µg; Bioanalyse), seftriakson (CRO-30µg; Bioanalyse), sefotaksim (CTX-30µg; Bioanalyse), seftazidim (CAZ-30µg; Bioanalyse) antibiyotik diskleri yerleştirilir. Besiyerleri 30-35°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra incelenerek aztreonam, seftriakson, sefotaksim, seftazidim disklerine ait inhibisyon zonlarının amoksisilin klavulonik asit diski karşısında genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üreme olmayan bir bölgenin bulunması durumunda çift disk sinerji testi sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.2., Şekil 2.3.).

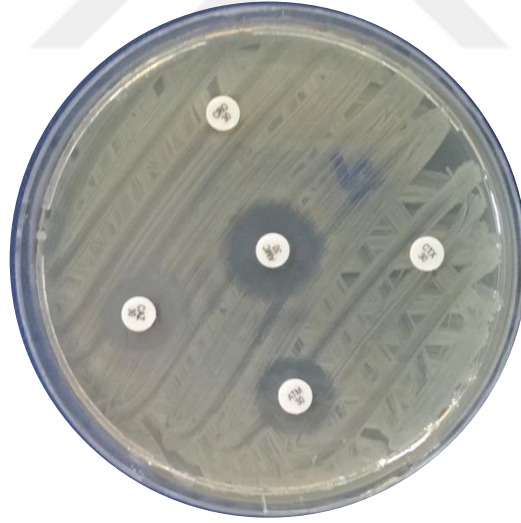
Tablo 2. 7. Çift Disk Sinerji Testi İçin Kullanılan Antibiyotiklerin Zon Çapları (EUCAST 2019).

Antibiyotik İsmi Ve Sembolü Ve Konsantrasyonu	Zon Çapı	
	S	R
Amoksisilin Klavulanik asit (AMC) 20/10 µg	≥19	≤16
Aztreonam (ATM) 30 µg	≥26	≤21
Seftazidim (CAZ) 30 µg	≥22	≤19
Seftriakson (CRO) 30 µg	≥25	≤22
Sefotaksim (CTX) 30 µg	≥20	≤17

S: Duyarlı R: Dirençli



Şekil 2. 2. Çift Disk Sinerji Testi Pozitif Sonuç.

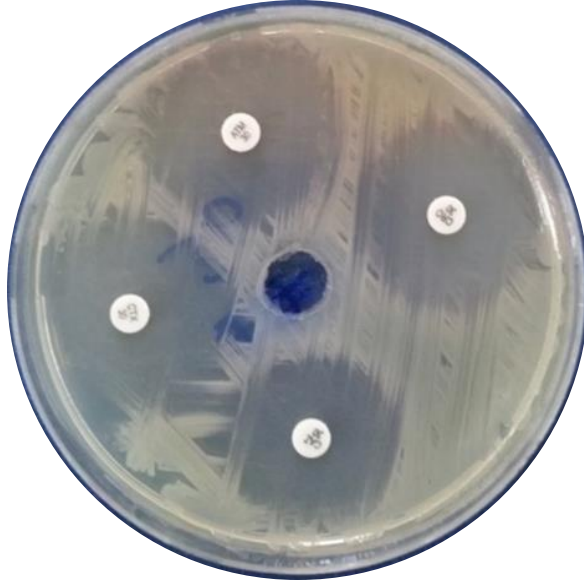


Şekil 2. 3. Çift Disk Sinerji Testi Negatif Sonuç.

2.7. Üç Boyutlu Test Yöntemi

Hazırlanan 0.5 Mc Farland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu MHA yüzeyine sürüldü. Petrinin ortasına yakın tarafta ve kullanılan antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire şeklinde kesildi. Oluşan besiyeri çizgisinin içine test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile dolduruldu. İnokülasyonlar gerçekleştirildikten sonra seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam diskleri yerleştirildi. Bu disklerle ait inhibisyon zonlarının dairesel biçimde bozulma, kesintiye uğrama veya bakterinin inoküle edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi; antibiyotiğin yoğun inokülasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini gösterir ve GSBL pozitif olarak değerlendirildi (Kamburoğlu, 2011; CLSI, 2013).

Mikroorganizma agar yüzeyine ekilir daha sonra agar yüzeyinde delik açıldı. Yarığın içi bakterinin de olduğu sıvı besiyeri ile dolduruldu. Antibiyotik diskleri yarıktan 3 mm uzakta olacak şekilde dizildi. Yarığa bakan taraftaki inhibisyon zonunda bozulma, daralma olması pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Gülay, 2004) (Şekil 2.4.).



Şekil 2. 4. Üç Boyutlu Test Yöntemi

3. BULGULAR

Bu araştırmada Tablo 3.1’de gösterilen idrar, yara, kan ve diğerkltrlerden izole edilen 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* olan toplam 150 izolatın Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) enzim varlığı ve antimikrobiyal dirençliliği araştırılmıştır.

Tablo 3. 1. *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının İzole Edildiği Klinik rnekler

rnek Türü					
İzolat	İdrar	Yara	Kan	Diğerk	Toplam
<i>E. coli</i> (125)	90	20	2	13	125
<i>K. pneumoniae</i> (25)	14	3	5	3	25
Toplam (150)	104	23	7	16	150

İzole edilen suşların sevislere göre dağılımı tablo 3.2’de verilmiştir. Buna göre izolatların toplam ağırlıklı olarak poliklinik 63 (%42,00) rneklerinden elde edildiği saptanmıştır. İzolatların diğerk servislerdeki dağılımı ise, klinik 57 (%38,00), yoğun bakım 30 (%20,00) olarak belirlenmiştir. *E. coli* türü olarak gelen sevislere göre dağılımı ağırlıklı olarak klinik 50 (%40,00) rneklerinden elde edildiği saptanmıştır. İzolatların diğerk servislerdeki dağılımı ise, poliklinik 48 (%38,40), yoğun bakım 27 (%21,60) olarak belirlenmiştir. *K. pneumoniae* türü olarak gelen sevislere göre dağılımı ağırlıklı olarak poliklinik 15 (%60,00) rneklerinden elde edildiği saptanmıştır. İzolatların diğerk servislerdeki dağılımı ise, klinik 7 (%28,00), yoğun bakım 3 (%12,00) olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2.).

Tablo 3. 2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

İzolat	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Yoğun Bakım	27	21,60%	3	12,00%	30	20,00%
Poliklinik	48	38,40%	15	60,00%	63	42,00%
Klinik	50	40,00%	7	28,00%	57	38,00%
Toplam	125	100,00%	25	100,00%	150	100,00%

Çift disk sinerji test (ÇDST) ile yapılan araştırmada GSBL varlığı araştırılmıştır. ÇDST’nde aztreonam, seftazidim, setriakson, sefotaksim ve amoksisilin/klavulonik asit, antibiyotikleri kullanılmıştır. İlk aşamada amoksisilin/klavulonik asit merkeze yerleştirilmiştir ve diğer antibiyotikler arasında 25 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilerek uygulanmıştır. Bu test sonucunda 150 izolatın 104 tanesinde (%69,33) GSBL pozitif olarak bulundu. Ayrıca incelenen 150 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* bakterisinin 104 tanesinde (%69,33) genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi varlığı tesbit edilmiştir. Türler göre GSBL varlığı incelendiğinde *E. coli* için 125 izolatta 85 (%68,00) ve *K. pneumoniae* için 25 izolatta 19 (%76,00) GSBL varlığı tesbit edilmiştir (Tablo 3.3.).

Bu tez çalışmasında GSBL tespiti için fenotipik tarama testleri olarak, çift disk sinerji, kombine disk difüzyon testi ve üç boyutlu kullanılmıştır. EUCAST tarafından (Tablo 4.4) GSBL doğrulanması için kombine disk difüzyon testi önerilmektedir. Çift sinerji testi ile *E. coli* suşlarının 85’si (%68,00) pozitif ve 40 (%32,00) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 19’ü pozitif (%76,00) ve 6 (%24,00) negatif bulunmuştur. Üç boyutlu test ile *E. coli* suşlarının 105’i (%84,00) pozitif ve 20 (%16,00) negatif, *K. pneumoniae* suşlarının 17’si (%68,00) pozitif, 8’i (%32,00) negatif olarak saptanmıştır (Tablo 3.3.).

Hazırlanan 0.5 Mc Farland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu MHA yüzeyine sürüldü. Petrinin ortasına yakın tarafta ve kullanılan antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire

şeklinde kesildi. Oluşan besiyeri çizgisinin içine test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile dolduruldu. (Kamburoğlu, 2011; CLSI, 2013).

Mikroorganizma agar yüzeyine ekilir daha sonra agar yüzeyinde delik açıldı. Yarığın içi bakterinin de olduğu sıvı besiyeri ile dolduruldu. Antibiyotik diskleri yarıktan 3 mm uzakta olacak şekilde dizildi. Yarığa bakan taraftaki inhibisyon zonunda bozulma, daralma olması pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Gülay, 2004).

Tablo 3. 3. Kombne Disk Difüzyon, Çift Disk Sinerji, Üç Boyutlu Test Yöntemi Sonuçlar

İzolat					
Yöntem			<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Toplam
Kombine Disk Difüzyon	Pozitif	Sayı	77	17	94
		Yüzde (%)	61,60%	68,00%	62,67%
	Negatif	Sayı	48	8	56
		Yüzde (%)	38,40%	32,00%	37,33%
	Toplam		125	25	150
Çift Disk Sinerji Testi	Pozitif	Sayı	85	19	104
		Yüzde (%)	68,00%	76,00%	69,33%
	Negatif	Sayı	40	6	46
		Yüzde (%)	32,00%	24,00%	30,67%
	Toplam		125	25	150
3D Test Yöntemi	Pozitif	Sayı	105	17	122
		Yüzde (%)	84,00%	68,00%	81,33%
	Negatif	Sayı	20	8	28
		Yüzde (%)	16,00%	32,00%	18,67%
	Toplam		125	25	150

Tablo 3. 4. Antimikrobiyal Disk İçeriği ve Zon Çapı Sınır Değerleri (EUCAST 2019).

Enterobacteriaceae-İdrar Dışı				
Antimikrobiyal	Disk İçeriği (mg)	Zon Çapı Sınır Değeri (mm)		
		S ≥	I	R <
Ampisilin	10	14	-	14
Sefuroksim(IV)	30	19	-	19
Sefuroksim aksetil (p.o.)	30	19	-	19
Sefaleksim	30	14	-	14
Sefotaksim	5	20	18-19	17
Seftriakson	30	25	23-24	22
Sefiksim	5	17	-	17
Sefotaksim	5	20	18-19	17
Sefepim	30	27	25-26	24
Nitrofuratoin	100	11	-	11
Fosfomisin (p.o.)	200	24	-	24
Amoksilin-Klavulanik asit	20-10	19	-	19
Piperasilin-Tazobaktam	30-6	20	18-19	17
Seftazidim	10	22	20-21	19
Amikasin	30	18	16-17	15
Siprofloksasin	5	26	25	24
Levofloksasin	5	23	20-22	19
Trimetoprim-Sülfametoksazol	1.25-23.75	14	12-13	11
İmipenem	10	22	17-21	16
Meropenem	10	22	17-21	16
Ertapenem	10	25	23-24	22
Kolistin	-	-	-	-
Tigesiklin	15	18	16-17	15
Netilmisin	10	15	13-14	12
Aztreonam	30	26	22-25	21
Trimetoprim-Sülfametoksazol	1.25-23.75	14	12-13	11
Gentamisin	10	17	15-16	14

Kombine disk difüzyon yöntemiyle denenen 11 antibiyotik için EUCAST (2019)'a göre mm'lik zon çaplarının % oranları *E. coli* için Netilmisin (NET) %21,60 orta duyarlı, %48,00 dirençli bulunmuştur. Fosfomisin'e (FOS) %0,00 orta duyarlı, %8 dirençli, İmipenem'e (IPM) %4,80 orta duyarlı, %9,60 dirençli, Ertapenem'e (ETP) %0,00 dirençli, %3,20 orta duyarlılık gözlenmemiştir. Piperasilin –tazobaktam'a (TZP) %36,80 orta duyarlı, % 25,60 dirençli,

Amikasin'e (AK) %32,00 orta duyarlı, %27,20 dirençli, Meropenem'e (MEM) orta duyarlılık gözlenmemiştir, % 1,60 dirençlilik belirlenmiştir. Aztreonam'a (ATM) %24,00 orta duyarlılık, %14,40 dirençlilik, Seftazidim'e (CAZ) %9,60 orta duyarlı, %24,00 dirençli, Gentamisin'e (CN) %27,20 orta duyarlı, % 40,80 dirençli, Siprofloksasin'e (CIP) %8,00 orta duyarlı, %28,00 dirençli bulunmuştur (Tablo 3.5, 3.6.).

E. coli'nin dirençli olduğu antibiyotiklerin oranlarının fazladan az olana sıralanmış şekli: Netilmisin (%48,00) > Gentamisin (%40,00) > Siprofloksasin (%28,00) > Amikasin (%27,00) > Piperasilin-Tazobaktam (%25,60) > Seftazidim (%24,00) > Aztreonam (%14,40) > Imipenem (%9,60) > Fosfomisin (%8,00) > Ertapenem (%3,20) > Meropenem (%1,60) olarak bulunmuştur (Tablo 3.5.).

K. pneumoniae için ise; Netilmisin'e (NET) %36,00 orta duyarlı, %60,00 dirençli, Fosfomisin'e (FOS) %0,00 orta duyarlı, %28,00 dirençli, Imipenem'e (IPM) %28,00 orta duyarlı, %4,00 dirençli, Ertapenem'e (ETP) orta duyarlılık göstermemiş, %8,00 dirençli, Piperasilin-Tazobaktam'a (TZP) %32,00 orta duyarlı, % 24,00 dirençli, Amikasin'e (AK) %16,00 orta duyarlı, % 8,00 dirençli, Meropenem'e (MEM) orta duyarlılık tespit edilememiştir ve %8,00 dirençli, Aztreonam'a (ATM) %12,00 orta duyarlı, % 24,00 dirençli, Seftazidim'e (CAZ) %4,00 orta duyarlı, %24,00 dirençli, Gentamisin'e (CN) %32,00 orta duyarlı, %12,00 dirençli, Siprofloksasin'e (CIP) %40,00 orta duyarlı, %20,00 dirençli bulunmuştur (Tablo 3.5.).

K. pneumoniae'nin en fazla dirençli olduğu antibiyotikler: Netilmisin (%60,00) > Fosfomisin (%28,00) > Piperasilin-Tazobaktam=Aztreonam=Seftazidim (%24,00) > Siprofloksasin (%20,00) > Gentamisin (%12,00) > Amikasin=Ertapenem=Meropenem (%8,00) > Imipenem (%4,00) olarak bulunmuştur (Tablo 3.8.).

Tablo 3. 5. İzole Edilen 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* Suşlarının Denenen 11 Antibiyotik İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen mm’lik Zon Çaplarına Göre Orta Duyarlı ve Dirençlilik % Oranları

İZOLATLAR	NET		FOS		IPM		ETP		TZP		AK		MEM		ATM		CAZ		CN		CIP	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
<i>E. coli</i> n : (125)	13-14	<12	-	<24	17-21	<16	23-24	<22	18-19	<17	16-17	<15	17-21	≤16	21-25	<21	20-21	<19	15-16	<14	25	<24
	13-12	8-11	0	22-23	17-21	13-15	23-24	19-21	18-19	6-16	16-17	13-15	0	14-15	21-25	16-20	20-21	10-18	15-16	3-13	25	12-23
	%21.60	%48.00	%0	%8.00	%4.80	%9.60	%0	%3.20	%36.80	%25.60	%32.00	%27.20	%0	%1.60	%24.00	%14.40	%9.60	%4.00	%27.20	%40.80	%8	%28.00
<i>K. pneumoniae</i> n : (25)	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
	13-14	<12	-	<24	17-21	<16	23-24	≤22	18-19	<17	16-17	<15	17-21	≤16	21-25	<21	20-21	<19	15-16	<14	25	<24
	13-14	6-11	0	12-23	17-21	13-15	23-24	19-21	18-19	6-16	16-17	13-15	0	14-15	21-25	16-20	20-21	10-18	15-16	11-13	25	12-23
	%36.00	%60.00	%0	%28.00	%28.00	%4.00	%0	%8.00	%32.00	%24.00	%16.00	%8.00	%0	%8.00	%12.00	%24.00	%4.00	%24.00	%32.00	%12.00	%40.91	%20.00

NET; netilmisin, FOS: fosfomisin, IPM; fosfomisin, IPM; imipenem, ETP; ertapenem, TZP; piperasilintazobaktam, AK; amikasin, MEM; meropenem, ATM; aztreonam, CAZ; seftazidim, CN; gentamisin, CIP; siprofloksasin, I; ortaduyarlı, R; dirençli

Tablo 3. 6. İzole Edilen 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* Suşlarının Denenen 11 Antibiyotik İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen Duyarlılıklarının mm Zon Çapları ve % Oranları

İZOLATLAR	NET	FOS	IPM	ETP	TZP	AK	MEM	ATM	CAZ	CN	CIP
<i>E. coli</i> n : (125)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	≥15	≥24	≥22	≥25	≥20	≥18	≥22	≥26	≥22	≥17	≥26
	16-20	24-32	22-32	25-38	20-30	18-22	22-34	26-32	22-34	17-21	26-38
	%30,40	%92,00	%85,60	%96,80	%37,60	%40,80	%98,40	%61,60	%66,40	%32,00	%64,00
<i>K. pneumoniae</i> n : (25)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	≥15	≥24	≥22	≥25	≥20	≥18	≥22	≥26	≥22	≥17	≥26
	20	24-30	22-24	25-35	20-28	18-22	22-34	26-36	22-32	17-21	26-38
	%4,00	%72,00	%60,00	%92,00	%44,00	%76,00	%92,00	%64,00	%72,00	%56,00	%40,00

NET; netilmisin, FOS: fosfomisin, IPM; fosfomisin, IPM; imipenem, ETP; ertapenem, TZP; piperasilintazobaktam, AK; amikasin, MEM; meropenem, ATM; aztreonam, CAZ; seftazidim, CN; gentamisin, CIP; siprofloksasin, S; duyarlı

Tablo 3. 7. İzole Edilen 125 *E. coli* İzolatının Disk Difüzyon Yöntemi İle Kullanılan 11 Antibiyotik İçin Dirençlilik Oranları ve Sayıları

Antibiyotikler	S		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Netilmisin (NET)	38	30,40%	27	21,60%	60	48,00%
Fosfomisin (FOS)	115	92,00%	0	0,00%	10	8,00%
Imipenem (IPM)	107	85,60%	6	4,80%	12	9,60%
Ertapenem (ETP)	121	96,80%	0	0,00%	4	3,20%
Piperasilin-Tazobaktam (TZP)	47	37,60%	46	36,80%	32	25,60%
Amikasin (AK)	51	40,80%	40	32,00%	34	27,20%
Meropenem (MEM)	123	98,40%	0	0,00%	2	1,60%
Aztreonam (ATM)	77	61,60%	30	24,00%	18	14,40%
Seftazidim (CAZ)	83	66,40%	12	9,60%	30	24,00%
Gentamisin (CN)	40	32,00%	34	27,20%	51	40,80%
Siprofloksasin (CIP)	80	64,00%	10	8,00%	35	28,00%

Bu çalışmada, idrar, yara, kan ve diğer kültürlerden izole edilen 125 *E. coli* izolatı için Netilmisine 38 (%30,40) tanesi duyarlı, 27 (%21,60) orta duyarlı ve 60 (%48,00) dirençli sonuç bulunmuştur. Fosfomisin için; 115 (%92,00) duyarlı, 10 (%8,00) dirençli belirlenmişken orta duyarlılık belirlenmemiştir. Imipeneme 107 (%85,60) duyarlı, 6 (%4,80) orta duyarlı, 12 (%9,60) dirençlilik belirlenmiştir. Ertapenem için 121 (%96,80) duyarlı, 4 (%3,20) direnç oranı bulunmuşken orta duyarlılık belirlenmemiştir. Piperasilin –tazobaktam için 47 (%37,60) duyarlı, 46 (%36,80) orta duyarlı, 32 (%25,60) dirençlilik görülmüştür. Amikasin 51 (%40,80) duyarlı, 40 (%32,00) orta duyarlı, 34 (%27,20) dirençli sonuç bulunmuştur. Meropenem 123 (%98,40) duyarlı, 2 (%1,60) dirençlilik görülmüş, orta duyarlılık belirlenmemiştir. Aztreonam 77 (%61,60) duyarlılık, 30 (%24,00) orta duyarlı, 18 (%14,40) direnç oranları tespit edilmiştir. Seftazidim için 83 (%66,40) duyarlı, 12 (%9,60) orta duyarlı, 30 (%24,00) direnç görülmüştür. Gentamisin 40 (%32,00) duyarlı, 34 (%27,20) orta duyarlı, 51 (%40,80) direnç bulunmuştur.

Siprofloksasin 80 (%64,00) duyarlı, 10 (%8,00) orta duyarlı ve 35 (%28,00) direnç bulunmuştur (Tablo 3.7.).

Tablo 3. 8. İzole Edilen 25 *K. pneumoniae* İzolatının Disk Difüzyon Yöntemi İle Kullanılan 11 Antibiyotik İçin Dirençlilik Oranları Ve Sayıları

Antibiyotikler	S		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Netilmisin (NET)	1	4,00	9	36,00	15	60,00
Fosfomisin (FOS)	18	72,00	0	0,00	7	28,00
Imipenem (IPM)	17	68,00	7	28,00	1	4,00
Ertapenem (ETP)	23	92,00	0	0,00	2	8,00
Piperasilin-Tazobaktam (TZP)	11	44,00	8	32,00	6	24,00
Amikasin (AK)	19	76,00	4	16,00	2	8,00
Meropenem (MEM)	23	92,00	0	0,00	2	8,00
Aztreonam (ATM)	16	64,00	3	12,00	6	24,00
Seftazidim (CAZ)	18	72,00	1	4,00	6	24,00
Gentamisin (CN)	14	56,00	8	32,00	3	12,00
Siprofloksasin (CIP)	10	40,00	10	40,00	5	20,00

Bu çalışmada, idrar, yara, kan ve diğer kültürlerden izole edilen 25 *K. pneumoniae* izolatı için Netilmisine 1 (% 4,00) duyarlı, 9 (%36,00) orta duyarlı, 15 (%60,00) dirençli bulunmuştur. Fosfomisin 18 (%72,00) duyarlı, 7 (%28,00) dirençli iken orta duyarlılık belirlenememiştir. Imipenem 17 (%68,00) duyarlı, 7 (%28,00) orta duyarlı, 1 (%4,00) dirençli bulunmuştur. Ertapenem 23 (%92,00) duyarlı, 2 (%8,00) dirençli bulunmuş iken orta duyarlılık belirlenmemiştir. Piperasilin-tazobaktam 11 (%44,00) duyarlı, 8 (% 32,00) orta duyarlı, 6 (% 24,00) dirençli bulunmuştur. Amikasin 19 (%76,00) duyarlı, 4 (%16,00), 2 (%8,00) dirençli bulunmuştur. Meropenem 23 (%92,00) duyarlılık, 2 (%8,00)

dirençli iken orta duyarlılık belirlenmemiştir. Aztreonam 16 (%64,00) duyarlı, 3 (%12,00) orta duyarlı, 6 (%24,00) dirençli tespit edilmiştir. Seftazidim 18 (% 72,00) duyarlı, 1 (%4,00) orta duyarlı, 6 (%24,00) dirençli tespit edilmiştir. Gentamisin 14 (%56,00) duyarlı, 8 (%32,00) orta duyarlı, 3 (%12,00) dirençli bulunmuştur. Siprofloksasin 10 (%40,00) duyarlı, 10 (%40,00) orta duyarlı, 5 (%20,00) dirençli bulunmuştur (Tablo 3.8.).



4. TARTIŞMA

GSBL üreten gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisi ve kontrolü dünya genelinde önemli bir problemdir. Bu problem ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır; Örneğin gram negatif bakteriler ile gelişen hastane enfeksiyonu insidansındaki artış, Amerikan Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Sürveyans Sistemi (National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS) verileri göre, 1975 yılında görülen gram negatif kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlarının oranı %67,8 iken 2003'te bu oran %73,6'ya çıkmıştır (NNIS, 2004).

Beta laktam antibiyotikler, bakteriosid etkili olmaları ve yan etkilerinin az olması sebebiyle tedavide sıklıkla tercih edilmektedirler. Klinikte kullanımlarının artması ile bu gruptaki antibiyotiklere direnç gelişimi oranlarında doğru orantılı olarak artmıştır (David ve Livermore, 1995). GSBL üreten mikroorganizmalar dünya genelinde tespit edilmelerine rağmen enzimlerin türü ve çeşidine göre bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir (Bella ve ark., 2002). *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri arasında *K. pneumoniae* en çok GSBL üreten mikroorganizmadır.

SENTRY antimikrobiyal surveyans programı raporunda 1998-1999 yılları arasında ve Güney Afrika ve Asya Pasifik bölgesinde yapılan çalışmalarda *E. coli* izolatlarında GSBL pozitif olanların yüzdesi 0 ile 35 aralığında saptanmıştır. Avustralya'da yapılan bir çalışmada GSBL pozitif bir suşa rastlanmamış, Güney Afrika, Çin ve Japonya'da yapılan çalışmalarda *K. pneumoniae* suşlarında %20'nin üzerinde GSBL üretimi gözlenmiştir. Yine aynı raporda Çin'de ise GSBL üretimi %35 olarak bildirilmiştir. (Bella ve ark., 2002; Winokur ve ark., 2001).

Birçok Avrupa ülkesinde de GSBL üretimi farklılık göstermektedir. 1998'de İspanya'da yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında GSBL üretimi %40 olarak rapor edilmiştir. (54, 70). Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir başka çalışmada ise *K. pneumoniae* suşlarında GSBL üretimi suşlarının %24.2 olarak bildirilmiştir.

1998-2005 yılları arasında ülkemizde yapılan çalışmalardaki GSBL üretiminde farklılık gözlenmektedir. *E. coli* suşlarında %0-63, *K. pneumoniae* suşlarında %15-77 oranında GSBL üretimi saptanmıştır. (Akçam ve ark., 2004; Akyıldız ve ark., 1998; Bülüç ve ark., 2003)

2005 yılında Kaçmaz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada GSBL pozitif *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının oranı sırasıyla %77, %63 olarak bulunmuşlardır. (Kaçmaz ve ark., 2005; Rota ve ark., 2000).

2003 yılında Bülüç ve arkadaşları tarafından İstanbul Üniversitesinde Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada GSBL üretimi oranları *K. pneumoniae* suşları için %48, *E. coli* suşlarının için ise %14 olduğu rapor edilmiştir (Bülüç ve ark., 2003).

2005 yılında Çetinkaya ve arkadaşları tarafından Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde çalışmaya dahil edilen 68 *Klebsiella spp.* suşunun 13 (%19)'ünde GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir.

GSBL enzimleri, penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamların hidrolizini gerçekleştirirler. Ancak mikroorganizmaların GSBL üretimi rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde tespit edilememektedir. Bu sebepten ötürü GSBL üreten bakteriler tespiti önem kazanmıştır. GSBL üretimini saptamak için birçok fenotipik yöntem kullanılmaktadır. (Moland ve ark. 2008; Drieux ve ark. 2008; Philippon ve ark.,1989; Bradford, 2001).

Genellikle tercih edilen yöntemler; Çift disk sinerji (ÇDS) testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri, E-test ve otomatize sistemlerdir. (Vercauteren ve ark., 1997).

Çalışmamızda GSBL tespiti için 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* suşlarında fenotipik tarama testleri olarak, çift disk sinerji testi, 3D test ve kombine disk difüzyon testi kullanıldı. Elde ettiğimiz GSBL pozitif suşların yöntem ve sonuçları; Kombine disk yönteminde *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 94 (%62,67), Çift disk sinerji yönteminde *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 104 (%69,33), Üç boyutlu testte ise *E. coli* ve *K. pneumoniae* 122 (%81,33) olarak bulunmuştur.

GSBL oranları Amerika ve Kanada gibi gelismis ülkelere göre yüksek, Türkiye’de yapılan çalışmalarla, büyük oranda benzer sonuçları elde ettik ancak üç boyutlu test te *E. coli* için GSBL pozitif suşların oranı daha yüksek bulunmuştur.

Diğer bazı dünya ülkelerindeki oranlara göre biraz yüksek bulunmuştur, bunun sebebi hastane infeksiyonlarında ve toplum kökenli infeksiyonların ampirik tedavide genis spektrumlu antibiyotiklerin sıklıkla ve bilinçsiz kullanımının sonucu olabilir.

Çift disk sinerji yöntemi ilk kez 1988 yılında Jarlier tarafından tanımlanmıştır. Test amoksisilin klavulonik asit diskinin çevresine yerleştirilen sefalosporin disklerinin zonlarında klavulonik asit diskinin doğru zon genişlemesiyle saptanmaktadır.

Mehli ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole ettiği *E. coli* izolatlarında Çift Disk Sinerji ile Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz varlığı araştırılmıştır. 212 *E. coli* izolatı için (%49) GSBL pozitif bulmuştur (Mehli ve ark. 2007).

Muhtaseb ve Kaygusuz yapmış oldukları çalışmada 59 *E. coli* izolatında ÇDST ile GSBL çalışılmıştır ve 20 örnekte (%34) GSBL pozitif sonuç çıkmıştır (Muhtaseb ve Kaygusuz 2008).

Özgüneş ve ark.,yaptıkları çalışmada 100 *K. pneumoniae* izolatında ÇDST ile % 47 GSBL pozitif sonuç bulunmuştur (Özgüneş ve ark., 2006).

Hoşoğlu ve ark., birlikte yaptıkları çalışmada 41 *K. pneumoniae* izolatında ÇDST ile GSBL araştırılmış ve 33 bakteride (% 80,48) GSBL pozitif sonuç bulunmuştur (Hoşoğlu ve ark., 2007).

Kendi yaptığımız çalışmamızda ise çift disk sinerji yöntemi ile GSBL üretimini araştırdık ve 125 *E. coli* izolatı için 85 (%68,00) ve 25 *K. pneumoniae* izolatı için 9 (%36,00) GSBL pozitif sonuç belirlenmiştir.

Çalışmamızda 125 *E. coli* 25 *K. pneumoniae* suşuna GSBL saptama testi uygulanmıştır. *E. coli* suşların %68’ünde (n=85) tarama testi pozitif olduğu gözlenmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ile GSBL saptanmayan 40 suşun negatif

olarak bulunmuştur. *K. pneumoniae* suşlarında ise %76'ünde (n=9) GSBL pozitif olduğu gözlenmiştir. 16 suş ise negatif olarak bulunmuştur.

Bunun sebebi çift disk sinerji yönteminde diskler uygun aralıkta yerleştirilmediginde sinerjistik etki görülülemez böylece testin tekrarına veya sonuçların yanlış olarak negatif değerlendirilmesine yol açmış olabilir. Ancak diskler arası uzaklığın ve enzim substrat profillerinin testin özgüllüğünü önemli oranda degistireceği için, laboratuvarların diskler arası uzaklığı ve testte kullanılacak antibiyotikleri bulunduğu bölge ve hastanenin genel direnç oranlarını, enzim tiplerini göz önüne alarak belirlenebilir.

Çalışmamızda çift disk sinerji testinin rutin disk difüzyon testiyle aynı anda uygulanabilecek, ek mali harcama ve zaman gerektirmeyen, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla kullanılacak duyarlı bir test olduğu sonucuna varılmıştır.

Kombine disk difüzyon yöntemi *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* suşlarında CLSI tarafından önerilen fenotipik GSBL doğrulama testidir. Çalışmamızda 125 *E. coli* suşuna kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL saptama testi uygulanmıştır. Suşların %61,6'ünde (n=77) tarama testi pozitif olduğu gözlenmiştir.

K. pneumoniae suşlarında ise %68'ünde (n=17) GSBL pozitif olduğu gözlenmiştir. Sekiz suş ise negatif olarak bulunmuştur.

Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL saptanmayan; 28 *E. coli* ve 6 *K. pneumoniae* suşlarında sefoksitine dirençli, sefepime duyarlı olarak gözlenmiştir. 20 *E. coli* ve 3 *K. pneumoniae* suşunda ise sefepime duyarlı olup sefoksitine orta duyarlı ve duyarlı görülmesi AmpC beta laktamaz üretiminin olduğu düşünülmüştür. Suşlarda GSBL ve AmpC beta laktamazlar beraber üretildiğinde klavulonik aside direnç gözlemlendiğinden klavulonik asit etkisi görülmemektedir.

E. coli ve *K. pneumoniae* suşlarında, GSBL dışında baska beta laktamaz içermeleri durumunda tarama testleri ve fenotipik doğrulama yöntemleri yetersiz kalmakta, yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir. Bu nedenden dolayı fenotipik yöntemler başarısız olduğunda, kesin tanı için moleküler yöntemlerin kullanılmalıdır.

Kombine disk difüzyon yöntemi rutin disk difüzyon yöntemiyle aynı anda uygulanabilir kolay bir testtir. Eğitimli personel, ek zaman ve malzemeye ihtiyaç yoktur.

1984 yılında Thomson ilk kez Üç boyutlu testi tanımlanmıştır. Bu testte antibiyotik disklerinden uzakta olacak şekilde besiyeri dairesel olarak 3 mm bistüri ile kesilerek çizgisinin içine test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile doldurulur.

1992 yılında Thomson ve ark yaptıkları çalışmada doğrulanan *Enterobacteriaceae* suşlarının %79'ünde üç boyutlu test GSBL üretimi pozitif olarak bulmuştur. (Thomson ve ark., 1992).

Türkiyede yapılan bazı çalışmalarda Akyıldız ve arkadaşları üç boyutlu test kullanarak GSBL üretimini %13 oranında, Hoşgör ve arkadaşları ise %35 pozitif olarak bulmuşlardır (Akyıldız ve ark., 1998; Hoşgör ve ark., 1998).

Çalışmamızda üç boyutlu test ile yapılan deneyler sonucunda GSBL varlığı *E. coli* için 125 izolatta 105 (%84,00) *K. pneumoniae* için de 25 izolatta 17 (%68,00) tespit edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda üç boyutlu testte sefotaksim ve seftriakson disklerinin seftazidime göre daha duyarlı bulunduğu bildirilmiştir (Datta ve ark., 2004; Mac Kenzie ve ark., 2002; Thomson, 1992).

Üç boyutlu test yapmış olduğumuz diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında doğru sonuçlar elde edebilmek için fazla miktarda bakteriye ihtiyaç duyulmaktadır, bu sebeple az miktarda üreme olan durumlarda doğrudan kültürden çalışmanın zor olduğu ve bakterinin üreyebilmesi için inkübasyon süresi uzatılması gereklidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak günümüzde enfeksiyon hastalıkları ve girişimsel cerrahi uygulamaların oranı arttığı için antibiyotik kullanımında gün geçtikçe giderek artmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçların verileri doğrultusunda bakterilerin antibiyotiklere olan dirençleri her geçen gün arttığı ve hızla da artmaya devam ettiği gözlemlenmiştir.

Direnç kazanan bakteriler mortalite ve morbitite oranını arttırarak insan emeği ve maddi kayıplar yaşanmasına sebep olduğu için halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Bu problemin çözümünde mikrobiyoloji laboratuvarının rolü GSBL üreten bakterilerin daha doğru ve kesin sonuçların fenotipik yöntemlerin yanında genotipik testlerde yapılmalıdır.

EUCAT ve CLSI gibi kuruluşlar antibiyotik direncinin azaltılması için kısıtlı olan antibiyotik bildirim uygulamaları ile önlem ve tedbir almaya çalışmaktadırlar. Gereksiz ve aşırı antibiyotik kullanımından dolayı, henüz direnç gelişimini önleyebilecek etkili olan bir yol tam olarak bulunmamıştır. Daha etkili olacak yöntemler araştırılmalı ve uygulanmaya konmalıdır.

ÖZET

***E.coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların 3 Farklı Yöntemle Araştırılması**

E. coli *K. pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamazların farklı Yöntemlerle Araştırılması Amaç: Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde hastalardan izole edilen *E. coli* *K. pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamazların Kombine Disk Yöntemi, Çift Disk Sinerji Yöntemi ve Üç Boyutlu Test Yöntemleri ile tespiti amaçlanmıştır. Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda hastalardan izole edilen 125 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* suşlarına 3 yöntem uygulanmıştır. Suşlar konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde tanınmıştır. Çift disk sinerji yöntemi ile GSBL üretimini 125 *E. coli* izolatu için 85 (%68,00) ve 25 *K. pneumoniae* izolatu için 9 (%36,00), üç boyutlu test ile *E. coli* için 125 izolatta 105 (%84,00) *K. pneumoniae* için de 25 izolatta 17 (%68,00), kombine disk difüzyon yöntemi ile *E. coli* için 125 izolatta 77 (%61,60) *K. pneumoniae* için 25 izolatta 17 (%68,00) tespit edilmiştir. Enterobacteriaceae suşlarında farklı direnç genleri sebebiyle fenotipik yöntemlerle GSBL saptanması genellikle yanlış sonuçlara neden olmaktadır. Çalışmamızda *E. coli* izolatları için fenotipik yöntemlerden, üç boyutlu test , *K. pneumoniae* izolatu için ise çift disk sinerji yöntemi en yüksek GSBL saptama yöntemi olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonucuna göre moleküler testler ile fenotipik testlerin bir arada çalışılması önerilmektedir. şartlarına uygun olmayan merkezlerde GSBL araştırılmasında en etkili yöntem *E. coli* için üç boyutlu test , *K. pneumoniae* için çift disk sinerji testi uygulanmalıdır.

Anahtar sözcükler: GSBL, *E.coli*, *K.pneumoniae*, Kombine Disk Yöntemi, Çift Disk Sinerji Yöntemi, Üç Boyutlu Test Yöntemleri

SUMMARY

Investigation of Extended Spectrum Beta Lactamases in *E.coli* and *Klebsiella* spp. Strains by 3 Different Methods

Detection of Methicillin Resistance in Nosocomial Isolates of *Staphylococcus aureus* Strains by Different Methods Objective: Methicillin resistance of nosocomial *Staphylococcus aureus* was planned to be detected by oxacillin and ceftazidime disk diffusion tests, automated system, MRSA latex agglutination test and *mecA* gene which is responsible for the resistance by polymerase chain reaction. Material and Methods: In this study, 50 *S.aureus* strains isolated from patients who were hospitalized in Gazi University Hospital. The isolates were identified by the BD Phoenix automated system. *mecA* gene which is accepted as gold standard was tested by polymerase chain reaction. Results: In the oxacillin disk diffusion test, 46 (92 %) of the *S.aureus*, in the ceftazidime disk diffusion test 49 (98 %) of the *S.aureus* isolates, in the BD Phoenix automated system 48 (% 96) of the *S.aureus* isolates, in the latex agglutination test 49 (98 %) of the *S. aureus* isolates were found to be resistant. The *mecA* gene was positive in 50 (100 %) of the *S.aureus* isolates polymerase chain reaction studies. Conclusion: Detection of methicillin resistance in staphylococci by phenotypical methods often leads to false results. In our study, the results of the phenotypical methods, latex agglutination test and ceftazidime disk diffusion tests were found to be same and the most appropriate method for detecting the methicillin resistance is detection of *mecA* gene by polymerase chain reaction is found to be same with the latex agglutination test and ceftazidime DDT. The result of this study is; in the center which is not suitable to make PCR, has to do latex agglutination test or ceftazidime DDT test for the effective results. Key Words: *mecA*, methicillin resistance, latex agglutination

Key words: ESBL, *E.coli*, *K.pneumoniae*, Combined Disc Method, Double Disc Synergy Method, Three Dimensional Test Methods

6. KAYNAKLAR

- ABBOTT, S.L., J. O' CONNOR, T. ROBIN, B.L. ZIMMER VE J.M.JANDA. (2003). Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. J.Clin. Microbiol, 41: 4852-4854.
- AKÇAM FZ, GÖNEN __, KAYA O, YAYLI (2004). G. Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. Klimik Derg. 17(1): 47-49.
- AKÇAM, F. Z., GÖNEN, İ., KAYA, O., YAYLA, G. (2004). “ Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(1): 6-9.
- AKOVA M. (2008). Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S eds, Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 81-8.
- AKOVA M., (2004). “Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Var!”, *ANKEM Dergisi*, 18 (2):98-103.
- AKOVA, M. (2004). “Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve klinik önemi”, Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları, Ulusoy, S., Leblebicioğlu, H., Arman, D.(ed), *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 85-94.
- AKYILDIZ R, ÖZSOY MF, ALTUNAY H, KOÇAK N, ÇAVUSLU S, YENEN OS. (1998). *Klebsiella pneumoniae* suslarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığı ve beta laktam antibiyotik direncinin araştırılması. KL_M_K Derg. 11(2): 53-58.
- ALADAĞ MO, DURAK Y. (2007). Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'ların Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Fırat Sag Hiz Dergi*;2(4):40-50.
- AMBLER R.P. (1980). “The structure of beta-lactamases”, Phil Trans R. Society Biology, Londra, 289:321-331.
- ARDA M. (2000). Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda. Medisan Yayın Serisi no 46. Medisan Yayınevi, Ankara, Bölüm: 29.
- ARLET G, BRAMİ G, DECRE D, FLİPPO A, GAÏLLOT O, LAGRANGE PH. (1995). et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. FEMS Microbiol Lett. 1995; 134: 203-8.
- BARON EJ., PETERSON LR., FİNEGOLD SM. (1994). *Enterobacteriaceae*. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th edition; 362-387.
- BELL, C., KYRIAKIDES, A. (2002). “Pathogenic *Escherichia coli* in: Foodborne pathogens, Hazard, risk analysis and control”, *CRC Press*, Washington, 279-306.
- BELLA JM, TURNIDGE JD, GALES AC, PFALLER MA, JONES RN. (2002). The

- SENTRY APAC study group. prevalence of extended spectrum-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa:regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 42: 193-198.
- BİLGEHAN H. (2000). *Enterobacteriaceae*, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 10. baskı, İzmir : Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi:1-102.
- BİLGEHAN H. (2000). Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. Baskı. Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1-103.
- BOZKURT H, KURTOĞLU M.G., AYGÜL K, BAYRAM Y, BERKTAS M. (2007). Nozokomiyal Kaynaklı *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi', *Turkish Medical Journal*, 1: 150-153.
- BRADFORD P. (2001). Extended spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14(4): 933-951.
- BRADFORD PA. (2001). Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.*; 14: 933-51.
- BRISSE S, GRİMONT F, GRİMONT PAD. (2006). The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes* 6: 159–196.
- BROOKS GF, CARROLL KC, BUTEL JS, MORSE SA (2010). Jawetz, Melnick ve Adelberg's Tıbbi Mikrobiyoloji. 24. Baskı. Çeviri Editörü: Yenen OŞ, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul, 253-4.
- BUSH K, JACOBY G A, MEDEİROS A A. (1995). A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*;39:1211–33.
- BUSH K, SYKES R B: (1990). Beta-lactamase inhibitors in perspective, *J Antimicrob Chemother* 25: 477.
- BUSH K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 259–263.
- BUSH K. (2001). New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and im pact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* ; 32: 1085-9.
- BUSH, K., JACOBY, G. A., MEDEİROS, A. A. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure", *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1211-1233.
- BÜLÜÇ M, GÜROL Y, BAL Ç. (2003). Genislemis spektrumlu beta laktamaz oranları (2000-2002). *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 33: 31-34.
- CARTER MW, OAKTON KJ, WARNER M, LİVERMORE DM. (2000) Detection of extended-spectrum betalactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk

method. *J Clin Microbiol*;38(11):4228–4232.

CEYLAN E. (2015). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella* Spp. Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GsbL) Sıklığının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, syf:26-27

CLOCK S, TABIBI S, ALBA L, KUBIN C, WHITTIER S, SAIMAN L. (2013). In vitro activity of doripenem alone and in multi-agent combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013, doi:pii: S0732–8893(13)00147-8.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). M 100-S 15.Gür D. Editörlüğünde Türkçe'ye çevrilmiştir: Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onbeşinci Bilgi Eki, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013). Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23 (ISBN 1-56238-865-7 [Print]; ISBN 1-56238-866-5 [Electronic]). CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document M100-S20. CLSI,2011.

ÇETİN ve ark. (2006). Semptomatik üriner sistem enfeksiyonlarında üropatojenler ve izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılığı *Ankem Dergisi*, 20(3): 169-172.

ÇİFTÇİ A, AKSOY A. (2019). Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları Erişim: [https://www.researchgate.net/publication/281677438] Erişim Tarihi: 19.04.2019.

ÇOLAK, Ö. (2011). Klinik Örneklerden İzole Edilen *E. coli* Ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerde Çift Difüzyon Tarama Ve Çift Sinerji Yöntemleri İle Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, syf:31.

DATTA P, THAKUR A, MISHRA B, GUPTA V. (2004). Prevalence of clinical strains resistant to various beta lactams in a tertiary care hospital in India. *Jpn J Infect Dis*. 57: 146-149.

DOYLE, MP., SCHOENI, JL. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, 1984;48(4):855-856.)

DRIEUX L, BROSSIER F, SOUGAKOFF W, JARLIER V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*; 14 (Suppl 1): 90-103.

ERDEM, B. (1999). Enterobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (Ed:Ustaçelebi Ş). Güneş tıp kitabevi, Ankara; 471-515.

EUCAST, (2019). Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST Disk Diffusion Method. Erişim: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documen

ts/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf]. Erişim Tarihi: 24.04.2019

EUCAST, (2019). Clinical Breakpoints For Bacteria. Erişim: [http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/] Erişim Tarihi: 24.04.2019

EUCAST, (2019). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim:[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf]. Erişim Tarihi: 24.04.2019

FLUIT AC, VISSER MR, SCHMITZ FJ. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev.; 14: 836-71.

FORBES A, SAHM F. (2003). Weissfeld S Principles of antimicrobial action and resistance, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 11th edition*, St.Louis, CV Mosby Co, Chapter 15, p.214-220.

GÜLAY Z. (1999) Antimikrobiyal İlaçlara Direnç, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabı, *Güneş Kitabevi*, Ankara, s.91-108.

GÜLAY Z. (2001). “Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç”, *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, (5): 210-229.

GÜLAY Z. (2004). ESBL’lerin Tanı Yöntemleri. Köksal I.(ed): Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar kitabı, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, s.13-25.

GÜLAY Z. (2004). 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; 13-26.

GÜLAY Z. (2005). “Beta Laktamazlar ve Klinik Önemi: İndüklenebilir beta-laktamazlar: Özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi, Mezuniyet sonrası eğitim dizisi-2”, Ulusoy, S. ed., *Bilimsel Tıp Yayınevi*, 45-69, Ankara.

GÜR , D. (2004). ‘ GSBL’lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar ‘ , *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara , 5-12.

GÜR D. (2004). “GSBL’lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş 74 Spektrumlu Beta Laktamazlar”, Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara.

GÜR D. (1996). Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi*; 1:80–86.

HARVEY RA., CHAMPE PA. (2006). Lippincott Illustrated Reviews, Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü: Anđ Ö, Nobel Tıp Kitabevleri Ltdi Şti., İstanbul, 175-179.

HOSGÖR M, ÖZKAN F, YAPAR N, TÜNGER A, ÖZİNEL MA. (1998). Genişlemiş spektrumlu betalaktamazların belirlenmesinde çift disk sinerji testi ile üç boyutlu yöntemin karşılaştırılması. *KL_M_K Derg.* 11(2): 59-60.

- HOŞOĞLU S, GÜNDEŞ S, KOLAYLI F, KARADENİZLİ A, DEMİRDAĞ K, GÜNAYDIN M, ALTINDİS M, ÇAYLAN R & UCMAN H. (2007). 'Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals', *Indian J Med Microbiol* ., 25(4):346-350.
- JACOBY G, HAN P, TRAN J. (1997). Comparative in vitro activities of carbapenem L-749, 345 and other antimicrobials against multidrug-resistant gram negative clinical pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*;41(8):1830.
- KAÇMAZ B, ÇAKIR FÖ, AKSOY A. (2005). Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz saptanması. *ANKEM Derg*. 19(3): 125-129.
- KAMBUROĞLU A (2011). Genişletilmiş-Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Beta Laktamaz Direncinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- KART Y. ve ark. (2011). Alternatif tedavi seçeneği olarak fosfomisinin komplike üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşlarına etkinliği *Ankem Dergisi*, 25(1): 12-16.
- KAYAALP S.O. (1998). Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe, 8. Basım, 175-200.
- KAYSER FH, BİENZ KA, ECKERT J, ZİNKERNAGEL RM (2005). *Medical Microbiology*. Stuttgart, Germany, 292-6.
- KFOURY, J.N.S., ARAJ, G.F. (2003). "Recent developments in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases", *British Medical Journal*, 327: 1209-1913.
- KHANFAR, H.S., BİNDAYNA, K.M., SENOK, A.C., BOTTA, G.A. (2009).: Extended spectrum beta- lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries*, 3(4): 295-299,.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JONDA, W. M., SCHRECKENBER, P. C., WINN, W.C. (1997). "JR: Enterobacteriaceae, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", *Lippincott Company*, Philadelphia, Newyork. 171.
- LEBLEBİCİOĞLU H, USLUER G, ULUSOY S. (2008). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 285-329.
- LIVERMORE D.M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*; 8: 557-84.
- LIVERMORE D.M. (1987). Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics, *Drug 34 (Suppl 2)*: 64.
- LIVERMORE D. M. (1995). "Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance", *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(4): 557-584.
- LIVERMORE D.M. (2001). Detection of beta-lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 8(1): 59-64.

- MABİLAT C, COURVALİN P. (1990). Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 34: 2210-6.
- MAC KENZİE FM, MİLLER CA, GOULD IM. (2002). Comparison of screening methods for TEM and SHV derived extended spectrum beta lactamase detection. *Clin Microbiol Infect*. 8(11): 715- 724.
- MALOUİN, F., BRYAN, L.E. (1986). "Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30 (1): 1-5.
- MEDSCAPE. (2013). *Klebsiella* Infections [online]. Erişim: [http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview#a0104]. Erişim Tarihi: 9.12.2014.
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). EMB Agar (Merck 1.01347). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020105.pdf] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). İndol Testi. Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF0B809AAFBA588C3B] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). McFarland Solüsyon Deney Tüpleri. Erişim: [https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standards/] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Metil Red Testi (MR). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FFA200AF1613A76E21] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Mueller-Hinton Agar (Merck 1.05437). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020264.pdf] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Nutrient Agar (NA) Besiyeri (Merck 1.05450). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020120.pdf] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Oksidaz Testi (Bactident Oxidase (Merck 1.13300)). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EF87C42C67A356329D] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Simmons Sitrat Agar (Merck 1.02501). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EFDDDF1821F0523986] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Sitrat Testi. Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FFC0671D8648333F35] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Sulfate, İndole, Motility Medium; Sülfat İndol, Hareket Besiyeri (Merck 1.05470). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020311.pdf] Erişim Tarihi: 23.04.2019

- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Üre Agar Besiyeri (Merck 1.08492). Erişim: [http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020265.pdf] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MİKROBİYOLOJİ.ORG (2019). Voges-Proskauer (VP) Testi. Erişim:[http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433C FFA79D6F5E6C1B43FF3754CB9777885187] Erişim Tarihi: 23.04.2019
- MOLAND ES, KİM SY, HONG SG, THOMSON KS. (2008). Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications. Part I Clin Microbiol News; 30: 71-7.
- NCCLS. (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Fourth Edition; Approved Standart. *NCCLS document M7-A4*, Pennsylvania.
- NNIS, (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.
- ÖNGEN, B. (2008). ‘Escherichia infeksiyonlarø ve *Klebsiella* infeksiyonlarø ’ Nobel Tø p Kitabevleri, İstanbul, 197-205, 221-226.
- ÖZGÜNEŞ I, ERBEN N, KİREMİTÇİ A, KARTAL E.D., DURMAZ G, ÇOLAK H, USLUER G, ÇOLAK E. (2006). ‘‘The prevelance of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates and risk factors’’, Saudi Med J., 27(5):608-612.
- ÖZSOY FM, ÖNCÜL O, YILDIRIM A, PAHSA A (2001). Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar: Klinik önemi ve etirdiği sorunlar. Flora dergisi 6(1): 3-21.
- PAİS P, KHURANA R, GEORGE, J. (2002). Urinary Tract İnfections: A Retrospective Survey of Causative Organisms and Antibiotics Prescribed in A Tertiary Care Setting. *Indian J Pharm*, 2002; 34:278-280.
- PANOS GZ, BETSI GI, FALAGAS ME. (2006). Systematic review:are antibiotics detrimental or beneficial fort he treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection?. *Aliment Pharmacol Ther*;24(5): 731-742.
- PATERSON DL, BONOMO RA. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*;18(4):657-686.
- PATRİCİA A. BRADFORD. (2001). Phd. What’s new in β -lactamases? Current Infectious Disease Reports; 3:13–19.
- PFALLER, M. A., JONES, R. N. (2002). Mystic Study Group (Europe): Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from the meropenem Yearly susceptibility Test Information Collection Programme’’, *Int. J. Antimicrob Agents*, 19(5): 383-388, (2002)
- PFALLER, M. R. (2016). Tıbbi Mikrobiyoloji 7. Baskı, Ankara
- PHİLİPPON A, LABİA R, JACOBY G. (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother*. 33 (8): 1131-1136
- PİTOUT JD, HOSSAİN A, HANSON ND. (2004). Phenotypic and molecular detectionof

CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*; 42: 5715–21.

PÎTOUT JD, REİSBİG MD, VENTER EC, CHURCH DL, HANSON ND (2003). Modification of the double disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol.*, Aug, 41(8): 3933-3935, (2003).

PÎTOUT, JD., LOUPLAND KB. (2008). Extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 8(3): 159–166.

RİCE, L. B., SAHM, D., BONOMO, R. A. (2003). “Mechanisms of resistance to antimicrobial agents (MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGANSEN, J. H., PFALLER, M. A., YOLKEN, R. H.(eds)”, *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., Washington DC, 1074-1101.

ROTA S, ÇIRAK MY, KALKANCI A, GÖKDAL, KUSTİMUR S. (2000). Comparison of inhibitör potentiated disk diffusion with double disk synergy test for the detection of extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Turkish J Infect*. 14 (4): 495-498.

RYAN KJ, RAY CG. (2004). Sherris Medical Microbiology (An Introduction to Infectious Diseases). *Enterobacteriaceae*. 4th edition; 343-71.

THOMSON KS, SANDERS CC. (1992). Detection of extended spectrum beta lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agent Chemother*. 36 (9): 1877-1882.

TÖRECI K. (2003). Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. *Flora*; 8: 89-110.

TÜNGER A, ÇAVUŞOĞLU C, KORKMAZ M. (2005). Asya Mikrobiyoloji. Dördüncü baskı. Asya tıp kitabevi, İzmir; 137-159.

ÜNLÜTÜRK, A.,TURANTAŞ, F. (1998). “Gıda Mikrobiyolojisi”, *Mengi Tan Basımevi*, İzmir, 605-606.

VERCAUTEREN E, DESCHEEMAER P, LEVEN M, SANDERS CC, GOOSSENS H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum betalactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol*, 1997;35(9):2191-2197.

VİLA, J., SÂEZ-LÔPEZ, E., JOHNSON, JR., RÖMLİNG, U., DOBRINT, U., CANTÔN, R., GISKE, CG., NAAS, T., CARATTOLI, A., MARTINEZ-MEDINA, M., BOSCH, J., RETAMAR, P., RODRÎGUEZ-BANO, J., BAQUERO, F., SOTO, SM. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4):437

WINN S, ALLEN S, JANDA W, PROCOP G, SCHRECKEBERGER G. KONEMAN E, WOODS G. (2006). Antimicrobial susceptibility testing. In: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th edition, United States of America,

Lippincott Williams and Wilkins, Chapter 17, p.785-803.

WİLLKE TOPÇU A. (2008). “Aminoglikozidler”. İçinde: WİLLKE TOPÇU A, SÖYLETİR G, DOĞANAY M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 294–302.

WİNOKUR PL, CANTON R, CASELLAS JM, LEGAKİS N. (2001). Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis*. 32 (2): 94–103.

YAO JDC. (2007). Moelering JR RCA. Antibacterial Agents. Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 9 th ed. ASM Pres, 1077-113.

YÜCE A. (2001) Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasir N. ÜYÜMEZ
Doğum Tarihi : 04 Nisan 1986
Doğum Yeri : Afyonkarahisar/Bolvadin
Yabancı Dili : İngilizce
e-mail : yasiruyumez@gmail.com

ÖĞRENİM

2010 Afyon Fatih Lisesi - Fen Bilimleri
2014 Afyon Kocatepe Üniversitesi - Biyoloji
Devam Anadolu Üniversitesi – Web Tasarımı ve Kodlama
2019 Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Lisansüstü Eğitim (Y.L.)