

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ
ÜRETEK NOZOKOMİYAL *ESCHERICHIA COLI*
İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ GENLERİ VE
KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. SÜNDÜZ GÖRGEÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ÇİĞDEM KUZUCU**

MALATYA-2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ
ÜRETEK NOZOKOMİYAL *ESCHERICHIA COLI*
İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ GENLERİ VE
KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. SÜNDÜZ GÖRGEÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ÇİĞDEM KUZUCU**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)
tarafından desteklenmiştir (2010/51).**

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada ve uzmanlık eğitimimde bilimsel ve disiplinli çalışma konusunda örnek aldığım başta danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Çiğdem KUZUCU ve Doç. Dr. Barış OTLU'ya,

Uzmanlık eğitimi süresince yapmış oldukları katkılarından dolayı; Sayın hocalarım, Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL, Prof. Dr. M. Sait TEKEREKOĞLU, Prof. Dr. Selma AY ve Doç. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI'na,

Laboratuvar çalışmaları sırasında dostluklarından ve tecrübelerinden çok şeyler öğrendiğim başta Bio. Neşe TAŞTEKİN, Uzm. Bio. Bennur DUMAN, Bio. Özge YILDIRIM ve diğer personel arkadaşlarıma,

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmelerine olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Saim Yoloğlu'na,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem, eşim ve çocuklarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLOLAR DİZİNİ.....	IV
RESİMLER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	3
2.1.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmeleri.....	4
2.1.3. Patogenez.....	4
2.2. Hastane İnfeksiyonları.....	6
2.2.1. Hastane İnfeksiyonlarının Kaynak ve Bulaşma Yolları.....	7
2.2.2. Hastane İnfeksiyonlarına Neden Olan Mikroorganizmalar.....	7
2.2.3. Hastane İnfeksiyonlarının Etkisi.....	7
2.3. Beta-laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	8
2.4. Antibiyotiklere Karşı Direnç Kazanma Mekanizmaları.....	10
2.4.1. Mutasyonlar.....	10
2.4.2. Horizontal Gen Transferi.....	11
2.4.3. Mobil Gen Elemanları.....	12
2.5. Gram Negatif Bakterilerin Beta Laktam Direnç Mekanizmaları..	14
2.5.1. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Değişiklikler.....	15
2.5.2. Dış Membran Geçirgenliğinde Azalma.....	15
2.5.3. Eflüks (Atım) Pompası.....	16
2.5.4. Antibiyotikleri İnaktive Eden Enzimlerin Sentezlenmesi.....	16
2.6. Beta Laktamazlar.....	17
2.7. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL).....	22
2.7.1. Tanım ve Sınıflandırma.....	22
2.7.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Enzim Tipleri.....	25
2.7.3. Nadir Gözlenen GSBL Enzimleri.....	31
2.7.4. GSBL'nin Klinik Önemi.....	32

2.7.5. GSBL Saptama Yöntemleri.....	32
2.7.6. GSBL Saptanmasında Kullanılan Diğer Yöntemler.....	34
2.7.7. Moleküler Yöntemler.....	36
2.8. GSBL Üreten İzolatların Klonal Yayılımını İzlemede Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	43
3.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması.....	43
3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	46
3.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Araştırılması.....	46
3.4. Suşların Saklanması.....	47
3.5. GSBL Enzimlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması.....	48
3.5.1. DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon).....	48
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	49
3.5.3. PZR Reaksiyonun Agaroz Jelde Elektroforezi.....	50
3.6. <i>E. coli</i> 'nin Genotiplendirilmesinde Kullanılan PFGE Protokolü..	51
4. BULGULAR.....	55
4.1. DD Yöntemine Göre Antibiyotik Duyarlılık Deneylerinin Sonuçları	56
4.2. Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması.....	57
4.3. Suşlarda Saptanan Beta Laktamaz Genleri.....	60
4.4. Suşlarda Saptanan Beta Laktamaz Genlerinin Birlikte Bulunma Sıklıkları.....	62
4.5. Yalnız CTX-M ve TEM/CTX-M Bulunduran <i>E. coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	63
4.6. Suşların PFGE Yöntemine Göre Tiplendirilmesi.....	64
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇLAR.....	85
7. ÖZET.....	87
8. SUMMARY.....	89
9.KAYNAKLAR.....	91

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hastane infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar.....	8
Tablo 2. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması.....	22
Tablo 3. Plazmidlerce kodlanan GSBL'ler.....	23
Tablo 4. GSBL'lerin sınıflandırılması.....	25
Tablo 5. PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler.....	50
Tablo 6. <i>E. coli</i> izolatlarının klinik servislere ve örneklere göre dağılımı.....	56
Tablo 7. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı.....	57
Tablo 8. <i>E. coli</i> izolatlarının beta laktamaz gen birliktelikleri ve genotipleme....	60
Tablo 9. <i>E. coli</i> izolatlarının beta-laktamaz gen oranları.....	62
Tablo 10. <i>E. coli</i> izolatlarının beta-laktamaz gen birliktelikleri.....	63
Tablo 11. Yalnız TEM/CTX-M ve CTX-M bulunduran izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	64

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. ÇDST ve DD yöntemine göre GSBL saptanması.....	47
Resim 2. CTX/CTL E-test.....	47
Resim 3. CTX-M PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	58
Resim 4 TEM PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	58
Resim 5. OXA-2 grup PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	58
Resim 6. PER PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	59
Resim 7. SHV PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	59
Resim 8. OXA-10 grup PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	59
Resim 9. GSBL üreten <i>E. coli</i> suşlarının XbaI enzimi ile kesimin ardından Oluşan PFGE modellerine ait örnekler.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gram negatif bakterilerde direnç mekanizmalarının şematizasyonu.....	14
Şekil 2. <i>E. coli</i> dendogramı.....	67

KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	: “ATP-binding cassette”
AFLP	: “Amplified fragment length polymorphism”
AME	: Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
AP-PZR	: “Arbitrarily primed PZR”
APA	: Aminopenisilanik asit
ASA	: Aminosefalosporanik asit
bç	: Baz Çifti
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CNS	: Santral Sinir Sistemi
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CMT	: Complex Mutant TEM
CFN-1	: Sitotoksik nekrotizan faktör 1
CR	: “Common Region”
CFU	: “Colony Forming Unit”
CAT	: Kloromfenikol Asetil Transferaz
ÇDST	: Çift Disk Sinerji Testi
DAF	: “DNA Amplification fingerprinting”
DD	: Disk Difüzyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ddNTP	: dideoksinükleotit Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMB	: “Eosin Methylene Blue”
ERIC	: “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Element”
ExPEC	: Extraintestinal Patogenite Gösteren <i>E. coli</i>
FDA	: “Food Drug Administration”
Pap	: “Pyelonephritis Associated Pili”
GISA	: Glikopeptidlere Azalmış Duyarlılık Gösteren <i>S. aureus</i>
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
HCL	: Hidroklorik Asit
HST	: Hücre Süspansiyon Tamponu

HPT	: Hücre Parçalama Tamponu
Inc	: “Incompatibility”
IRT	: Inhibitor Resistant TEM Beta Laktamaz
IS	: İnsersiyon Sekans
KNS	: Koagülaz-Negatif Stafilokoklar
KPC	: <i>K. pneumoniae</i> Karbapenemaz
LZR	: Ligaz Zincir Reaksiyonu
MATE	: “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”
MFS	: “Major facilitator Süper Aile”
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MLST	: Multilokus Sekans Tipleme
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OM	: Outer Membran
PBP	: Penisilin Bağlayan Proteinler
PFGE	: “Pulsed Field Gel Electrophoresis”
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: “Random Amplified Polymorphic DNA”
RC	: “Rolling Circle”
RE	: Restriksiyon Enzimi
REP	: “Repetitive Extragenic Palindromic Element”
RI	: Direnç İntegronu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RND	: “Resistance-nodulation division”
RP	: Direnç Plazmidi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SI	: Süper İntegron
SMR	: “Small Multidrug Resistance”
SSCP	: Tek Zincirde Konformasyon Polimorfizmi
TBE	: Trizma baz-Borik asit-Etilen diamin Tetra Asetik Asit
TE	: Trizma baz-Etilen diamin tetra asetik asit
UPEC	: Üropatojenik <i>E. coli</i>

UV : Ultra Viyole
VRE : Vankomisin Dirençli Enterokok
VISA : Vankomisine Azalmış Duyarlılık Gösteren *S. aureus*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastaların hastaneye başvurduğu dönemde inkübasyon döneminde olmayan, hastaneye yatıştan 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki 10 gün içinde ortaya çıkabilen infeksiyonlar hastane infeksiyonu olarak adlandırılırlar. Günümüzde hastanede yatarak tedavi görmekte olan hastaların yaş ortalamalarının giderek artması, cerrahi ve tanısal amaçlı invaziv yöntemlerin sıkça kullanılması, gelişen teknolojiyle ilişkili olarak hastaların yaşam sürelerinde ve hastanede yatış sürelerinde uzama nedenleriyle hastane infeksiyonlarının görülme sıklığı artmaktadır. Hastane infeksiyonlarının mortalite, morbidite ve tedavi maliyeti üzerine artırıcı etkisi tüm dünyada ve ülkemizde de önemli bir sorundur (1,2).

Hastane infeksiyon etkenleri ve direnç profilleri ülkeler, hastaneler ve hatta aynı hastanenin değişik birimleri arasında farklılıklar göstermektedir. Hastane infeksiyonu etkeni Gram-negatif çomaklardan *Escherichia coli* (*E. coli*) artan direnç mekanizmaları nedeniyle büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu suşlarda en sık gözlenen antibiyotik direnç mekanizması ise genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimidir (3).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar; penisilinleri, sefalosporinleri, aztreonamı parçalayan ve etkileri klavulanik asitle inhibe olan enzimlerdir. GSBL varlığı *Klebsiella* türleri ve *E. coli* izolatlarında daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella* spp. ve *Shigella flexneri*'de dahil olmak üzere birçok enterik bakteride bildirilmiştir. Rutin olarak uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri başta *Klebsiella* türleri ve *E. coli* olmak üzere Gram-negatif bakterilerde GSBL üretimini göstermede yetersizdir. Bu testlerle *in vitro* olarak beta-laktam antibiyotiklere duyarlı oldukları saptanan bazı suşlar *in vivo* olarak dirençli bulunmakta ve bu durum tedavide

başarısızlığa yol açmaktadır (4). GSBL enzimleri taşıyan genler sıklıkla plazmidler aracılığı ile diğer bakterilere aktarılabilmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde GSBL varlığı ile diğer beta-laktam olmayan ajanlar arasında ilişki saptanmıştır Dolayısıyla GSBL üreten bakterilerin neden olduğu infeksiyonlar uygun tedavi seçiminde gecikmeye, mortalite ve morbiditede artışa neden olmaktadır (5). Bütün bu nedenlerden dolayı GSBL enzimlerinin kısa sürede tanımlanması; uygun tedavinin başlanması ve etkili infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından oldukça önemlidir (4).

İlk GSBL 1980’li yılların başlarında Atina’da bulunmuş olan TEM enzimidir. Bu enzimi kodlayan gen bölgesindeki 1-4 aminoasitlik değişimlerle, günümüzde 450’nin üzerinde farklı yapıda GSBL varyantı beta laktamaz enzimleri saptanmıştır. Bu enzimlerin en önemlileri; SHV (Sulfhydryl Variable), TEM (Hasta adı: Temoneira), CTX-M (Cefotaximase—Munich), PER_(Pseudomonas Extended Resistance), VEB (Vietnam Extended-Spectrum Beta-Lactamase), GES(Guyana ESBL), TLA(Tlahuicas adlı Hindistan kabilesi), BES (Brezilya ESBL) ve OXA (Oxacillin)’ beta laktamazlardır (4, 6).

Son yıllarda tüm dünyada GSBL prevalansı artmış durumdadır. Bu durumdan epidemik plazmidler ve spesifik klonların yaygın olması sorumlu tutulmuştur. Epidemik plazmidlerde sıklıkla; TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 ve CTX-M-32 gibi GSBL enzimleri saptanmış durumdadır (7). Özellikle CTX-M gen prevalansındaki artış, pandemi tehlikesi olarak ifade edilmektedir ve CTX-M-15 gen pozitifliğinin tüm dünyada klonal bir şekilde yayılımı hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonlar için endişe verici bir durum oluşturmaktadır. Tüm dünya, bu konu ile ilgili gerekli epidemiyolojik araştırmaların yapılması ve uygun kontrol önlemlerinin alınması konusunda uyarılmış durumdadır (8).

Ülkemizde GSBL ile ilgili moleküler çalışmalar son zamanlarda artmakla birlikte sınırlı sayıdadır. Hastanemizde ilk kez yapılacak olan bu çalışma ile GSBL üreten hastane kökenli *E. coli* izolatlarında beta laktamaz gen tiplerini ve gen prevalansını tayin etmek, antibiyotiklere direnç gelişimi ilişkisini araştırmak ve hastane infeksiyonu etkeni izolatların klonal ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia cinsinin en önemli ve en sık görülen üyesidir. İnsan sindirim sisteminde bulunan *Escherichia coli* immün sistem bozukluklarında ya da sindirim sistemi savunma bozukluklarında fırsatçı infeksiyonlara neden olmaktadır (9).

2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

Peritriş kirpikleri (flagella) ile hareketli, ortalama 2-6 µm boyutlarında Gram negatif basillerdir. Aerobik ya da fakültatif anaerob ortamda, 37°C’de, seçici ve seçici olmayan besiyerlerinde hızla ürer. 1-2 µm çapında S tipi koloniler yaparlar. İhtiyaç duydukları besin maddeleri basittir, glukozu fermente eder, nitratı indirgerler, katalaz pozitif, oksidaz negatiftirler. Şekerleri ve diğer karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. Laktozu fermente etme özelliği sayesinde diğer *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* gibi patojen türlerden ayrılır. *E. coli*’nin laktozu fermente eden kolonileri Mac Conkey agar’da pembe-mor, Eosin methylene blue (EMB) agar’da ise metalik refle veren yeşil-siyah renkli koloniler oluşturur. Laktozu geç fermente eden ya da hiç fermente etmeyen kökenleride bulunabilir. Kapsüllü *E. coli* suşları mukoid koloni oluştururlar. Üreyi hidroliz edemezler. *E. coli*’nin çoğu türlerinde indol üretimi pozitifdir (9, 10, 11).

E. coli dış etkilere oldukça dayanıklı bir bakteridir. 60 °C’de 20–30 dakika, oda ısısında uygun şartlar altında uzun süre canlı kalır. Soğuğa dirençli, dezenfektanlara karşı ise dirençsizdirler. Malaşit yeşili, Brilliant yeşili ve fuksin gibi boyalar, safra, safra tuzları, sodyum tetra tiyosiyanat gibi maddeler varlığında üremeleri inhibe olur (9).

2.1.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmeleri

E. coli basilleri O (somatik) antijenlerine göre gruplara, H (kirpik) ve K (kapsül) antijenlerine göre serovarlara ayrılır. *E.coli*'de 180 kadar O ve 80 kadar K serogrupları bulunmaktadır. O antijenleri; somatik, ısıya dayanıklı lipopolisakkarit yapıda antijenlerdir. Kaynatmaya ve alkole dayanıklı, formole dayanıksızdır. Diğer grup enterik bakteriler ile çapraz reaksiyon verebilirler. Hareketli suşlarda bulunan H kirpik antijenlerinin 60'dan fazla serogrubu tanımlanmıştır. 100°C'de ısıtmakla, alkol ve proteolitik fermentler ile harap olurlar. K antijenleri kapsül antijenleridir. Polisakkarit yapıdadır. Isıya dayanıklı olup 100°C-120°C'de bir iki saat kaynatmakla harap olurlar.

Fimbria (pilus) antijenleri; protein yapıda, çeşitli hücrelere yapışmadan sorumlu ve 37°C'de oluşturulan saçak benzeri yapılardır. Kromozom aracılı pilus ve konjugatif plazmid ile kodlanan seks pilusu olmak üzere iki farklı sınıfa ayrılır. Kromozom aracılı pilus, bazı konaklarda bulunan spesifik reseptörlere bağlanırlar. Seks pilusu ise bakteriler arasında genetik bilginin transferinde önemlidir (9, 10, 11).

2.1.3. Patogenez

E. coli'nin patojenitesinden sorumlu olan virulans faktörleri; endotoksin, antijenik faz varyasyonu, Tip 3 sekresyon sistemi, adezin ve ekzotoksinlerdir. Bu faktörler sıklıkla plazmidler, patojenite adacığı ya da bakteriyofaj DNA'sı aracılığı ile aktarırlar. Patojen *E. coli* suşları intestinal ve ekstraintestinal infeksiyonlar olmak üzere iki tipte infeksiyon oluşturur (11, 12).

İntestinal *E. coli* İnfeksiyonları: Değişik mekanizmalarla ishale neden olan *E.coli*'nin 6 tipi tanımlanmıştır:

1. Enterotoksijen *E. coli* (ETEC)
2. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)
3. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC)
4. Enteropatojen *E. coli* (EPEC)
5. Enteroagregatif *E. coli* (EagEC)
6. Diffüz adezif *E. coli* (DAEC)

Ekstraintestinal *E. coli* İnfeksiyonları: *E. coli* suşları sindirim sistemi dışında, pek çok doku ve sistemde infeksiyon oluşturur. Sıklıkla idrar yolu infeksiyonları olmak üzere, nozokomiyal pnömoni, kolesistit, peritonit, osteomyelit, sepsis, yenidoğan menenjitleri gibi infeksiyonlara neden olabilir (12).

Üriner Sistem İnfeksiyonları: İntestinal diyare etkeni olan *E. coli*'den farklı olduğu için üropatojen *E. coli* (UPEC) olarak adlandırılmıştır. Kolon ve vajen kolonizasyonları infeksiyon için ilk basamaktır. Kadınlar erkeklere göre daha sık bu infeksiyonu geçirirler. İdrar kateterizasyonu, üriner sistem anomalileri, fekal inkontinans infeksiyon için risk faktörleri arasındadır. Kan yolu ile bakteriler böbrek ve mesaneye ulaşabilir. *E. coli* toplumdan kazanılmış idrar yolu infeksiyonlarında %80 oranında, nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarında ise %50 oranında etkindir (12, 13).

UPEC suşlarının mannoza dirençli ve duyarlı hemaglutinasyon özelliği olan iki tip adezini vardır. P pilus, afimbrial adezinler, Dr adezinler ve S pilus mannoza dirençli adezinlerden olup bakterinin epitel hücrelerine girişini kolaylaştırır. P pilus: bakteri kromozomunda bulunan pap genleri (pyelonephritis associated pili) ile kodlanır. Genellikle piyelonefrit yapan suşlarda bulunur. S pilus ise genellikle proksimal ve distal tübülüslerin epitel hücreleri, renal interstisiyum ve renal vasküler endotel hücrelere bağlanmadan sorumludur (12).

UPEC suşlarının diğer virulans faktörlerinden olan “ α -hemolizin” ise sitolitik özellikte bir toksindir. Eritrositlerde porlar oluşturarak lizise, inflamatuvar cevap ve doku hasarına neden olur. Sitokin üretimi, süperoksit üretimi ve ATP seviyelerinin düşmesini stimüle eder. Diğer bir toksin ise tam olarak işlevi belirlenemeyen “sitotoksik nekrotizan faktör-1”dir (CNF-1). Bunların dışında UPEC suşları bakterinin üremesini artıran enterobaktin, aerobaktin, yersiniobaktin olarak adlandırılan demir alım sistemlerine (siderofor) sahiptirler. Genellikle çoklu direnç genlerini taşıyan plazmidler aracılığı ile taşınır (12).

Menenjit ve Diğer Yaygın İnfeksiyonlar: *E. coli* yenidoğan menenjitlerinin en önemli nedenlerinden biridir. *E. coli* suşlarının %80 kadarında K1 polisakkarit kapsülü bulunmaktadır. *E. coli* K1 menenjitinin oluşumunda; sindirim sistemindeki mukozal kolonizasyonun ardından mukoz membrandan mikrobiyal geçiş, intravasküler alana invazyon ve bakteriyel çoğalma sorumludur. Bakteriemi eşik düzeyi $>10^3$ koloni/ml olduğu zaman *E. coli* K1 suşu kan beyin bariyerini (BBB) geçer ve santral sinir sistemine (CNS) invaze olur. Toksik bileşenler ve proinflamatuvar süreç sonunda BBB artması ve beyaz kan hücrelerin CNS'e geçişi ile menenjit tablosu ortaya çıkar. O18:K1:H7 klonun neden olduğu yenidoğan menenjiti tüm dünyada gözlenirken, daha az sıklıkla O83:K1 ve O45:K1 klonları bazı ülkelerde gözlenmiştir (12, 14).

Barsak dışında patojen olan *E. coli* suşlarına ExPEC adı verilir. *E. coli* sepsisemi tüm yaşlarda ortaya çıkabilir. Sindirim sistemi perforasyonu, apandisit veya cerrahi girişimler sırasında gelişir. Sıklıkla nozokomiyal patojen olarak saptanır ve antibiyotiklere daha dirençlidir. Ventilator kullanan hastalarda sıklıkla akciğer enfeksiyonlarına neden olabilirler (12).

2.2. Hastane Enfeksiyonları

Hastaların hastaneye başvurduğu dönemde inkübasyon döneminde olmayan, hastaneye yatışlarından 48-72 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki 10 gün içinde ortaya çıkabilen enfeksiyonlar “nozokomiyal enfeksiyonlar” olarak adlandırılırlar. Ancak lejyonelloz ve su çiçeği gibi uzun inkübasyon süresi olan enfeksiyonlar bu kurala uymazlar. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) nozokomiyal enfeksiyonları bir enfeksiyöz ajan veya toksinin varlığına yanıt olarak ortaya çıkan, hastaneye başvuru sırasında bulunmayan veya inkübasyon döneminde olmayan lokalize veya sistemik durum olarak tanımlar (15).

CDC tanımlarına göre nozokomiyal enfeksiyonlar; üriner sistem enfeksiyonu, cerrahi alan enfeksiyonu, pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonu, kemik ve eklem enfeksiyonu, merkezi sinir sistemi enfeksiyonu, kardiyovasküler sistem enfeksiyonu, göz, burun, boğaz ve ağız enfeksiyonu, gastrointestinal sistem enfeksiyonu, alt solunum yolu enfeksiyonu, üreme sistemi enfeksiyonu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu, sistemik enfeksiyonlar olmak üzere major gruplara ayrılmıştır. Her bir major grup da kendi içerisinde spesifik alt gruplara ayrılmıştır (16).

Hastane enfeksiyonları endemik ve epidemik olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. Bir hastalığın belli bir yerde belli bir zaman diliminde beklenenden fazla görülmesi ya da belli ortak özellikleri nedeniyle kümeleşme göstermesi epidemik hastane enfeksiyonu olarak tanımlanır. Hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %5'ini oluşturmakla birlikte, yüksek mortaliteye yol açmaları nedeniyle önemli enfeksiyonlardır (17). Epidemilerin büyük kısmı yoğun bakım ünitelerinde hayatı tehdit eden enfeksiyonlar şeklinde görülür. Yoğun bakım ünitelerinde bu enfeksiyonların sık görülmesi, invaziv girişimlerden, immün sistemin zayıflamasından ve kişiden kişiye transferin kolay olmasından kaynaklanmaktadır (18).

Bir hastanede hali hazırda varolan sporadik olarak gözlenen enfeksiyonlar endemik hastane enfeksiyonlarıdır. Etkili bir enfeksiyon kontrol programı uygulanan

hastanelerdeki infeksiyonların %90-95'ini oluşturur. Endemik hastane infeksiyon hızındaki artışlar; etkili infeksiyon kontrol önlemlerin alınmasını gerektirir (17).

2.2.1. Hastane İnfeksiyonlarının Kaynak ve Bulaşma Yolları

Mikroorganizmalar endojen ya da ekzojen kaynaklar ile infeksiyona neden olabilir. Endojen kaynaklar; hastanın derisi, sindirim sistemi ve solunum yollarında bulunan normal flora mikroorganizmalarıdır. Endojen infeksiyonlar genelde sağlık bakımı ile ilişkili girişim (örneğin vasküler kateter, üriner kateterler gibi) veya doku hasarı sonrası normal flora üyesi mikroorganizmaların yer değiştirmesiyle, bazen uygunsuz antibiyotik kullanımı sonrası *Clostridium difficile*'nin aşırı çoğalmasına bağlı olarak, bazende immün süpresyonlu hastalarda vücut direncinin düşmesine bağlı olarak kolonizasyondan sonra gelişebilir (16).

Ekzojen kaynaklar hastanın çevresindeki kaynaklardır. Hastanedeki diğer bir kişiden ya da çevreden kazanılan mikroorganizma yoluyla oluşan infeksiyonlardır. Çapraz infeksiyonlar sonucunda infeksiyonlu hastalardan veya kontamine araçlardan kaynaklanmaktadır. Kolonize hastalar veya sağlık çalışanları rezervuar olabilir. İnfeksiyonların taşınması insanlar arasında eller, tükürük, vücut sıvıları ile direkt temas, yoluyla, hastanın mikroorganizması ile kontamine olmuş damlacık yoluyla ve hasta bakımı sırasında kontamine olmuş personel yoluyla gerçekleşebilir (16).

2.2.2. Hastane İnfeksiyonlarına Neden Olan Mikroorganizmalar

Hastane infeksiyonlarının önemli etkenleri arasında Koagülaz-Negatif Stafilokoklar (KNS), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer Gram-negatif bakteriler bulunmaktadır (Tablo 1). 1940'lı yıllarda Gram pozitif bakteriler en sık etken olarak izole edilirken antibiyotik kullanımının yaygınlaşması ve invaziv girişimlerin artması ile 1960'dan sonra dirençli Gram-negatif bakteriler en sık izole edilen bakteri grubunu oluşturmuştur. Günümüzde ise merkezlere göre değişmek üzere bazı merkezlerde Gram-pozitifler ön planda iken, bazılarında Gram-negatif bakterilerle infeksiyon ilk sırayı almaktadır. Bu durumdan merkezlerin durumu, hasta popülasyonu, kullanılan antimikrobikler etkili olmaktadır (3).

2.2.3. Hastane İnfeksiyonlarının Etkisi

Nozokomiyal infeksiyonların morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini artırıcı etkisi vardır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yılda 2 milyon olarak gelişen

hastane infeksiyonları; 28 ile 45 milyon dolar ek maliyet ve 90 bin ölüme neden olmaktadır (19). İngiltere’de ise yılda 320 bin 994 hastada gelişen hastane infeksiyonları yılda 930 milyon pound ek maliyet getirmektedir (20). Ülkemizde yapılmış çalışmalara göre nozokomiyal infeksiyonlar hasta başına 440-2026 US dolar ek maliyet gerektirmekte ve yatış süresini 4 ile 23 gün kadar artırmaktadır (21, 22).

Tablo 1. Hastane infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar (3).

Gram pozitif mikroorganizmalar	Gram negatif mikroorganizmalar
Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> Metisiline dirençli KNS VISA (Vankomisine azalmış duyarlılık gösteren <i>S. aureus</i>) GISA (Glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren <i>S. aureus</i>)	Çoğul dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
VRE (Vankomisine dirençli enterokok)	Nonfermentatif bakteriler: <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Çoğul dirençli Gram pozitif çomaklar Çoğul dirençli <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ve atipik <i>Mycobacterium</i> spp, <i>C. difficile</i>	GSBL oluşturan Gram-negatif bakteriler

2.3. Beta-laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizması

Beta-laktam antibiyotikler; bakterisid, geniş spektrumlu ve güvenli olmaları nedeniyle klinisyenlerin çoğunlukla tercih ettiği ajanlardır. Yapısında bir azot ve üç karbon atomundan oluşan dört üyeli heterosiklik beta-laktam halkası bulundurulur. Beta-laktam molekülünün bisiklik çekirdek yapısına eklenen alifatik ya da siklik yan zincirler ile yeni türevleri elde edilir. Bu grup antibiyotikler; bakteriye şekli veren ve yüksek ozmotik basınca dayanıklılığını sağlamakla görevli hücre duvarında yer alan peptidoglikan (müreïn) tabakasının sentezini inhibe ederek etki gösterirler (23, 24). Bu grup antibiyotiklerin başlıcaları şunlardır;

Penisilinler: İlk olarak 1928’de Alexandr Fleming tarafından keşfedilmiştir. Doğal penisilinler *Penicillium chrysogenum* cinsi küflerden fermentasyon yolu ile elde edilir. Temel yapısını 6-Aminopenisilanik asit (6-APA) oluşturur. 6-APA; bir tiazolidin halkası ve buna bağlı beta-laktam halkasından oluşur. Tiazolidin halkasına bir karboksil (-COOH) ve beta-laktam halkasına bir amin grubu bağlanmıştır. Karboksil grubu genellikle serbesttir ve asiditeden sorumludur. Amin grubu ise yan zincirlerin eklenmesi suretiyle yeni türevlerin elde edilmesini sağlar. Penisilinlerin bakterisidal etkileri

bakterilerin çoğalma döneminde ve hücre duvarının temel bileşeni olan mürein sentezinin gerçekleştiği dönemde ortaya çıkmaktadır. Üremekte olan bakterinin Penisilin Bağlayan Proteinlerine (PBP) bağlanarak peptidoglikan zincirlerin birleşmesini önler (24, 25).

Sefalosporinler: İlk sefalosporin, penisilinden yaklaşık yirmi yıl sonra bulunmuştur. *Cephalosporicum acremonium* türü bir mantarın fermantasyon ürünü sefalosporin C'den elde edilir. Beta-laktam halkası ve dihidrotiazin halkasından oluşan 7-aminosefalosporanik asit (7-ASA) çekirdeğine sahiptir. 7-ASA temel yapıya değişik yan ürünlerin bağlanması ile çok sayıda sefalosporin türevleri elde edilmiştir. Dihidrotiazinin 3. pozisyonundaki değişiklikler ile ilacın farmokokinetiği ve metabolizması değişir. Böylece bazı bakterilerin üretmiş oldukları penisilinazlara dirençli olmaktadır. Sefamisin grubu sefalosporinlerden olan sefoksitin; beta-laktam halkanın 7.ci pozisyonuna metoksi grubunun eklenmesi ile beta laktamazlara dirençli hale gelir. Ancak kromozomal sefalosporinaz olan AmpC beta laktamazlar tarafından yıkılmaktadır (24, 26).

Karbapenemler: *Streptomyces cattleya*'dan elde edilen tienamisinden köken alır. Penisilin ve sefalosporinlerdeki gibi iki halkalı (bisiklik) beta-laktam çekirdeği bulundurulur. Ancak beş üyeli beta-laktam halkanın birinci pozisyonunda sülfür bulunmaz, bunun yerine bir karbon atomu vardır ve halkada bir adet çift bağ bulunur. Açılamin yan zinciri yerine hidroksietil yan zinciri bulundurulur. Beta-laktam antibiyotikler içerisinde en geniş spektrumlu olanlardandır. İmipenem, meropenem, ertapenem, doripenem gibi türevleri vardır. İmipenemin hidroksi etil yan zincirinin trans konfigürasyonunda olması beta laktamazlara dayanıklı olmasını sağlar (24, 27).

Monobaktamlar: *Chromobacterium violaceum*'dan elde edilmiştir. Molekülün çekirdek yapısında sadece monosiklik yapıda beta-laktam halkası bulunur. İkinci bir halka yoktur. Aztreonam grubun kullanımda olan tek üyesidir (28).

Beta-Laktamaz İnhibitörleri: “Suicide inhibitor” olarak adlandırılan bu bileşikler geriye dönüşümsüz olarak beta laktamazları inaktive ederler. Zayıf antibakteriyal etkisi vardır. Plazmid aracılı ya da kromozomal beta laktamazları inhibe eder. Ancak indüklenen tip beta laktamazlara etkinliği değişmektedir (24). Başlıcaları klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam'dır.

Klavulanat; *Streptomyces clavuligerus* kültüründen izole edilmiştir. Penisilin ve sefalosporinlerle sinerjistik etkilidir. Stafilokokların ve diğer Gram negatif bakterilerin ürettikleri beta laktamazları inhibe eder. Beta laktamaz ile birleşip, geri dönüşümsüz açıl enzim kompleksi oluşturarak beta laktamaz enziminin aktivitesini yok eder. Klavulanat; *Morganella morganii* ve *Citrobacter freundii* gibi bazı bakterilerin beta laktamazlarını indükler. Bunun sonucunda kendi yıkımını artırır ve etkinliklerini azaltır. (24).

Sulbaktam; 6-dezaminopenisilin sulfon'dur. Penisilin Bağlayan Protein 2 (PBP)'ye bağlanarak antibakteriyel aktivite gösterir. Tek başına antibakteriyel etkinliğe yol açmamakla birlikte penisilin ve sefalosporinler ile kombine edildiğinde antibakteriyel etkinliğinin güçlenmesine neden olur. Klavulanat'da olduğu gibi kromozomal beta laktamazları indükleyici özelliği yoktur (24).

Tazobaktam; Triazolil metil penisilanik asidin sulfon türevidir. Birçok önemli beta laktamazları önemli derecede inhibe eder. İn vitro etkinliği sulbaktam'dan daha fazladır. Kromozomal beta laktamazları indüklemeyebilir (24).

2.4. Antibiyotiklere Karşı Direnç Kazanma Mekanizmaları

Bakteriyel direnç, antimikrobiklerin klinikte ve diğer alanlarda fazla kullanımı ile ilişkili olacak şekilde son yıllarda artmış durumdadır. Bakteriler kromozomal mutasyonla ya da plazmid, transpozon ve integron gibi mobil genetik elemanlar ile direnç genlerini kazanırlar (29).

2.4.1. Mutasyonlar

Spontan mutasyonlar; sıklıkla yapısal bileşenlerle ilgili kromozomal mutasyonlar olup oldukça nadir gözlenir (10^{-6} – 10^{-8}). Mutasyonlar hatalı replikasyon ya da zarar gören DNA'nın doğru şekilde onarılmamasına bağlıdır. Bu tip mutasyonlar spontan mutasyon ya da "growth-dependent" mutasyonlar olarak adlandırılır. Örneğin *E. coli*'de *parC*, *gyrA* gen mutasyonuna bağlı kinolon direnci, *rpoB* gen mutasyonuna bağlı rifampisin direnci, dihidropteroat sentetaz mutasyonu ile sulfonamid direnci ve antibiyotiğin hücreye alımı ya da "eflüks" aracılı atılımı ile ilgili gerçekleşen biyokimyasal mutasyonlar bu tip mutasyonlardandır (29).

Hipermutasyon; mikroorganizmaların çok yüksek oranlardaki mutasyonlarına bağlı olarak kısa süreli ölümsüz forma geçişi olarak tanımlanır. Bu organizmalarda

mutasyon oranları 10-50'den 10 bin kata kadar artış göstermektedir. *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae* ve *P. aeruginosa* hipermutasyon gösteren mikroorganizmalardır (29).

Adaptif Mutasyon; çoğunlukla hücrelerin bölünmesi sırasında olmak üzere, bölünmeyen ya da yavaş bölünen mikroorganizmalarda ortaya çıkar. Ölmeyen mikroorganizmaların seleksiyona uğraması (nonlethal selection of microorganisms) adaptif mutasyon olarak adlandırılır. Adaptif süreç de normal şartlar altında antibiyotik dirençli mutantlar ortaya çıkar. Streptomisin *E. coli*'de hipermutasyona sebep olurken kinolon gibi bazı antibiyotikler; SOS mutajenik cevabı indükleyerek antibiyotik direncini önemli oranlarda artırabilir (30, 31).

2.4.2. Horizontal Gen Transferi

Direnç genlerinin mobil gen elemanları ile bir bakteriden diğerine ya da aynı hücre içerisinde bir genetik lokalizasyondan diğerine aktarımıdır. Birincisinde plazmidler ve konjugatif direnç transpozonları replikatif şekilde rol alırken, ikincisinde transpozon, gen kasetleri ve "ISCR-promoted" genleri rekombinasyon aracılı rol oynar. Bakteriler direnç genlerini konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon ile transfer ederler (32).

Konjugasyon; iki bakteri hücresinin seks piluslar ya da adezinler ile teması sonucunda genetik eleman aktarımı ve aynı zamanda replikasyon işlemidir. Hücreler arası bağlanma seks pilus olarak adlandırılan eksternal filamentöz uzantılar aracılığı ile meydana gelir. Pilus'un alıcı ve verici hücreler arasında kanca benzeri bir işlevi vardır. DNA transferi; oluşan porlar aracılığı ile sitoplazmik bölümler arasında gerçekleşir. Gram pozitif bakterilerde bulunan konjugatif plazmidler Gram negatif bakterilere göre daha küçüktürler ve bu durum daha az genetik bilgiye ihtiyaç duyan farklı mekanizmalar olduğunu göstermektedir. Plazmid transferinde iki unsur önemlidir. Birincisi plazmidin alıcı hücreye transferinde rol oynayan reseptör varlığı, ikincisi ise alıcı hücrede plazmid DNA'sının replikasyon işleminin gerçekleşebilmesidir. Konjugatif plazmidlerin geniş veya dar konak aralıkları olabilir ve benzer bakteri türleri arasında gerçekleşir. Gram negatif bakteri plazmidleri genellikle geniş konak aralığı gösterir. Genetik yapı test tüpü benzeri bir yapı ile transfer edilebilirken; mayalar ve Gram pozitif bakterilerde böyle yapılar yoktur (32, 33).

Transformasyon; ortamdaki ölü bakterilerden açığa çıkan DNA parçalarının alınıp bakteri genomuna integre edilebilmesi durumudur. *H. influenzae*, *Neisseriae* türleri, *S. pneumoniae*, *Bacillus* gibi bazı türler doğal olarak ekzojen DNA alabilirler. Bu türler kompetan olarak adlandırılır ve kompetans işlemi logaritmik çoğalma dönemlerinin sonlarına doğru gerçekleşir. Bakterilerin çoğunda doğal olarak DNA alım yeteneği yoktur. Kimyasal yöntemler ya da elektroporasyon ile plazmid ya da diğer DNA elemanlarının *E. coli* hücresi içine girişi sağlanabilir (33).

Transdüksiyon; direnç genlerinin bakteriyofaj denilen bakteri virüsleri aracılığı ile transferidir. DNA infekte edilen hücrelere aktarılır ve bakteri genomu içerisine eklenir (33).

2.4.3. Mobil Gen Elemanları

Plazmidler

Bir bakteri hücresinden diğerine horizontal gen transferi yapabilen, kromozom için elzem olmayan sirküler, çift iplikli DNA molekülleridir. Genellikle replikasyon fonksiyonlarının büyük bir kısmı konak hücre aracılığı ile sağlanmakla birlikte, plazmidler bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olurlar ve ayrı olarak tek başına bulunurlar. Konak hücre kromozomunun %10 ya da daha fazlasını oluşturur. Örneğin; *E. coli* 4700 kadar genden oluşur. Bu bakteride bulunan plazmidler ise 400 ya da daha fazla geni kodlayabilir. Direnç plazmidleri olarak adlandırılan plazmidler birden daha fazla antibiyotik direnç geni taşırlar. Diğer plazmidlerden olan metabolik plazmidler ise metabolik fonksiyonları kodlayan genleri taşıdıkları gibi virulans genleri de taşıyabilir (32, 33).

Plazmidler ile kodlanan antibiyotik direnci klinik kullanımda olan tüm antibiyotiklere direnci kapsar. Özellikle bunlar arasında sefalosporinler, florokinolonlar ve aminoglikozidler başta gelmektedir. Direnç plazmidlerinin çoğu konjugatifdir ve hücreler arası DNA transferini ve kendi transfer fonksiyonlarını kodlamaktadır (32, 33). Direnç plazmidi (RP) 1 geniş konak aralığı olan plazmidlerden biridir. İlk olarak *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. Bu plazmidler tüm Gram negatif bakterilerde transfer edilebilme özelliğindedir. TEM ve SHV tipi GSBL enzimlerini kodlayan gen transferinden sorumlu 80-300 kb aralığında "incompatibility" (Inc) grup plazmidlerden IncC, IncFI, IncHI2 ve IncM tanımlanmıştır ve GSBL için geniş spektrumlu aktiviteye neden olan G.C→A.T baz değişikliğinden sorumlu dört bazlık mutasyon genlerini taşırlar (34).

Transpozonlar

İnseriyon Sekans (IS) elemanlardan farklılaşan sıçrayıcı özellikteki mobil gen elemanlarıdır. IS gen elemanları bakteri hücresinin fenotipinde değişiklik yapabilen en az bir fonksiyonu kodlayan kısa DNA parçalarıdır. Direnç geni bulunduran transpozonlar belirli bir antibiyotiğe karşı direnci kodlayabilir. Transpozonlar genellikle modüler bir sistem olarak; kendi başlarına yerdeğişimi ya da hücre fonksiyonlarında değişikliğe neden olamayan IS elemanı gibi ya da DNA zincirinin bir parçası gibi davranır. IS elemanına bağımlı direnç transpozonları; merkezde antibiyotik direncini sunan gen bölümü ve terminal kısımda ise direkt tekrar ya da tersine tekrar yapılarına komşuluğu gerektirir. IS elemanı; tersine tekrar dizilimi genetik sabitliği sağlamakla birlikte, direkt tekrar dizilimi IS elemanı bulunan diğer alanlara göç edebilme fırsatını sağlar. Bu iki durum homolog rekombinasyon işleminde gözlenir (32, 33).

İntegronlar ve Gen Kasetleri

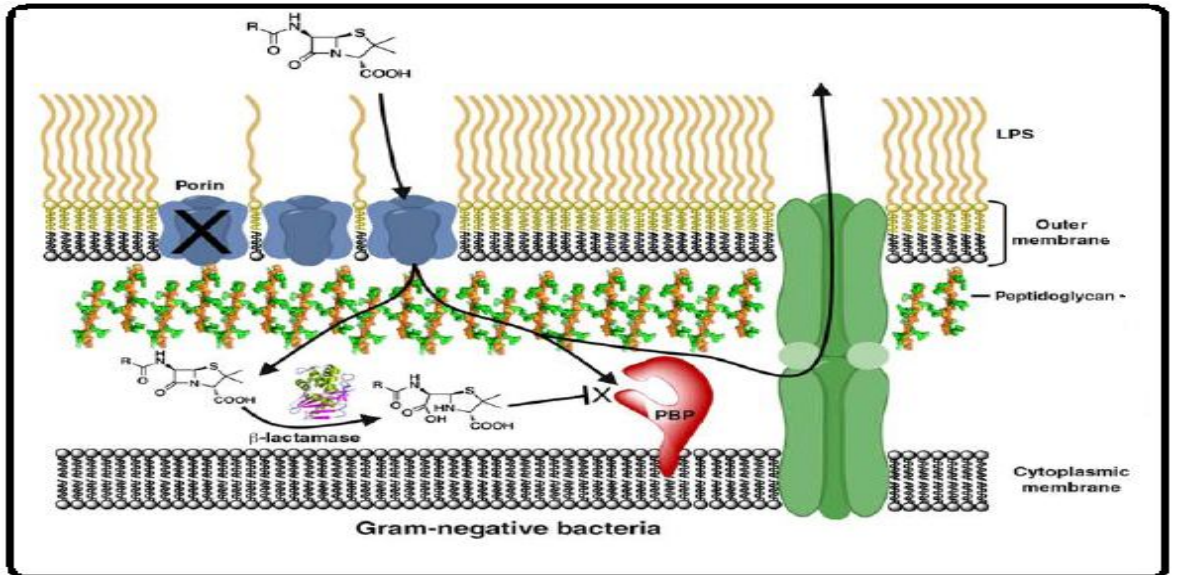
Bakteriyel integronlar gen yakalama sistemleridir ve transpozisyonun yerine spesifik rekombinasyon mekanizmalarını kullanırlar. Bu işlem bir integrondan diğerine ya da aynı integronda bir bölgeden diğer bölgeye geçiş şeklinde olur. İntegronlar; Direnç İntegronları (RI) ve Süper İntegron (SI) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. RI; antibiyotik ve dezenfektan direncinden sorumlu gen kasetlerini taşıyan, kromozom ya da plazmid üzerinde bulunan integronlardır. Sınıf 1, 2, 3 olmak üzere üç sınıf RI'ları vardır. Kromozomal yerleşimli olup çok fazla sayıda gen kaseti taşıyan integronlar ise SI olarak adlandırılır. *Enterobacteriaceae* ve non fermenterlerde sıklıkla Sınıf 1 integronlar bulunmaktadır. RI'larında <10 gen kaseti bulunurken, SI'larda 100'den fazla gen kaseti bulunmaktadır. RI'lar çok farklı türlerde bulunabilirken, SI'lar türe spesifiktir. RI'daki gen kasetleri çok büyük olasılıkla SI'lardaki gen kasetlerinden orijin alabilir. Sıklıkla *Vibrionaceae* ve *Pseudomonas* türlerinde bulunurlar (32, 35, 36).

Gen kasetleri; integron sınıfları arasında transfer edilebilen, küçük, çembersel çift iplikli DNA molekülleridir. Otonom olarak replike olamazlar. Gen kasetlerin 3' korunmuş bölgesinde bulunan 59 baz çiftlik (bç) bölge, yeni gen kasetlerin bağlanmasını sağlar. Gen kasetlerinde bulunan direnç genlerinin mobilizasyonu oldukça fazladır. Klinikte duyarlı durumda pek çok Gram negatif bakteriler, sınıf 1 integronlar ve gen kasetleri aracılığı ile birçok antibiyotiğe direnç genleri kazanırlar. IMP ve VIM metallo-beta laktamazlar, GES, VEB, OXA beta laktamazları kodlayan çok çeşitli gen kasetleri tanımlanmıştır (32, 35).

ISCR-aracılı Gen Transferi: Sınıf 1 integronun 3' korunmuş bölgesinde “Common Region” (CR) olarak adlandırılan bölgede yapılan çalışmalar neticesinde IS91-like (atipik sınıf IS) olarak adlandırılan bir bölge tanımlanmıştır. Ancak bu bölgenin IS'larda olduğu gibi tersine tekrar bölgelerinin olmadığı saptanmıştır. “Rolling circle” (RC) yer değişimi olarak adlandırılan farklı transpozisyon ve rekombinasyon sistemleri vardır. ISCR elementlerinin sayısı günümüzde 12'ye ulaşmıştır. Trimetoprim direnç geni, plazmid aracılı kinolon direnç geni (*qnr*) ve aminoglikozid direnç genleri ile ilişkili *ISCR1* saptanmıştır. Aynı şekilde *ISCR1* ile ilişkili olarak CTX-M-2 geni birçok Gram negatif bakteride ve *Enterococcus faecium* ve *Streptococcus agalactiae* gibi Gram pozitif bakterilerde bulunmuştur. CMY-1, DHA-1, VEB, PER beta laktamazlarda *ISCR1* aracılı olarak saptanmıştır (37).

2.5. Gram Negatif Bakterilerin Beta Laktam Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotikler günümüzde yüksek etkinlik, düşük maliyet, minimal yan etki ve kolay alım nedeniyle sık kullanılan ilaç gruplarındandır. Bu nedenle bu grup antibiyotiklere karşı gelişen direnç son yıllarda gittikçe artmaktadır. Direnç; 1. Antibiyotiğin hedef bölgesindeki (PBP gibi) değişiklikler, 2. Antibiyotiği parçalayan enzimlerin (beta laktamaz) gelişimi, 3. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasını engelleyen porin değişikliklerine bağlı geçirgenlik azalması, 4. Aktif pompa (efluks) sistemleri sonucu gelişebilmektedir (38, 39, Şekil 1)



Şekil 1. Gram negatif bakterilerde direnç mekanizmalarının şematizasyonu (38).

2.5.1. Penisilin Bağlayan Proteinlerde Değişiklikler

Penisilin Bağlayan Protein'ler (PBP) bakterinin hücre duvarının şekillenmesinde rol alan peptidoglikan sentezini katalize eden proteinlerdir. Yüksek molekül ağırlıklı (transpeptidaz ve transglukozilaz) ve düşük molekül ağırlıklı enzimler (karboksi-peptidazlar) olmak üzere iki bölüme ayrılırlar. 50 kD'dan büyük PBP'ler transpeptidaz, daha küçük molekül ağırlığındakiler ise karboksi-peptidaz olarak işlev görürler. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler A, B ve C sınıflarına ayrılır. Sınıf A PBP'ler sitoplazmik uzantı şeklinde, transmembranöz olarak bulunan proteinlerdir, transglukozilasyon denilen glikan zincirlerin uzamasından sorumludurlar. Sınıf B PBP'ler ise hücrenin terminal kısımlarında olup hücrenin esas şeklini almasında anahtar role sahiptir. Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler genellikle A, B ve C sınıf PBP'lerde bulunmakla birlikte genellikle sınıf C PBP'lerde yer alırlar. C sınıf PBP'ler C1, C2, C3 olarak alt tiplere ayrılır. *E. coli* PBP'leri genellikle sınıf A'da 1a, 1b, 1c PBP, sınıf B'de 2 ve 3 PBP, sınıf C'de ise 4, 5, 6, 6b, 7, 4b, AmpH şeklinde bulunur. Beta-laktam ajanlar; PBP'ler ile farklı derecelerde etkilenir. D-alanin-D alanin dipeptidine olan benzerliği nedeniyle beta laktam ajanların intihar bileşikleri olarak davranırlar. PBP'lerin aktif serin bölgesi beta laktam halkasının karbonil kısmı ile birleşir ve kovalent bağlı açıl enzim kompleksini oluşturur. Bu kompleks bakteri hücresinin yavaş hidrolizine neden olur. Böylelikle hücrenin peptidoglikan sentez basamakları etkili bir şekilde önlenir. Bakteri hücreleri genellikle beta laktam ajanlara düşük afinitesi olan PBP'lerin aşırı derecede sentezi ile direnç kazanırlar. Bu durum bakterinin genetiğinde meydana gelen nokta mutasyonlar veya homolog rekombinasyon ile endojen PBP'lerde değişim sonucu ortaya çıkar. Sonuç olarak ya PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotığe düşük afinite gösteren yeni PBP sentezlenmesi yoluyla direnç gelişir (24, 40, 41).

2.5.2. Dış Membran Geçirgenliğinde Azalma

Gram negatif bakterilerin dış membranı "Outer Membran" (OM) fosfolipid ve lipopolisakkaritden oluşan iki tabakalı bir yapıdır. Lipopolisakkarit molekülü; glukozamine bağlı bir fosfolipid olan lipid A ve oligosakkarid veya polisakkarit yapıda olan O somatik antijeninden oluşur. OM'nin iç kısmında bulunan fosfolipid bileşeni sitoplazmik membrandakine benzer; %80 fosfotidil etanolamin, %15 fosfotidilgliserol ve %5 kardiyolipin içerir. OM çok sayıda porin proteinleri vardır. Murein lipoproteini (Lpp), OmpA ve genel difüzyon porin proteinleri gibi porinler her hücrede yaklaşık $>10^5$ kopya olarak bulunur. Fosfolipid ve lipopolisakkarit yapıda meydana gelen

mutasyonlar OM sayısında azalma ile sonuçlanır. OM aynı zamanda seçici bariyer özelliğinde bir kanal gibi rol oynar ve içlerinden geçecek molekülün iyon yükü ve büyüklüğü yönünden seçicilik gösterirler. Bu özellik Gram negatif bakterilerin antibiyotiklerle olan etkileşiminde önemlidir (42).

Bakterilerde antibiyotiklere karşı dirençte OM’da iki temel değişiklik ortaya çıkar. Birincisi spesifik mutasyonlar ile dış membranda permeabilite azalması şeklinde fonksiyonel değişiklikler, ikincisi ise porinlerde sayıca azalma ya da porin kaybının neden olduğu değişikliklerdir (45). *E. coli* ile ilgili yapılmış çalışmalarda iki major porin; OmpK35 ve OmpK36’nın üretildiği saptanmıştır. GSBL üreten izolatlarda her iki porin kaybı sefoksitin direnci, geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç artışı ve özellikle ertapenem olmak üzere karbapenemlere duyarlılık azalmasına neden olur. Porin kaybı aynı zamanda GSBL üreten izolatlarda florokinolon gibi beta laktam dışı antibiyotiklere dirençten sorumlu mekanizmalar arasındadır (43, 44).

2.5.3. Eflüks (Atım) Pompası

Antimikrobiyal dirençte diğer neden ise antibiyotiklerin hücre dışına atılmasında kullanılan pompa sistemleridir. Bu pompalar “ATP-binding cassette” (ABC) süper ailesi, “Major facilitator” süper ailesi (MFS), “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) ailesi, “small multidrug resistance” (SMR) ilaçların alt gruplarını ve metabolitlerini transport eden süper aile ve “Resistance-nodulation division” (RND) süper ailesi olmak üzere beş gruba ayrılır. Genellikle kromozomal olarak kodlanmakla birlikte plazmid aracılığı ile de kodlanabilir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler farklı pompa sistemleri bulundurmaktadır. Pompalar seçicidir ve geniş substrat özgüllüğü vardır. Çoğunlukla sitoplazmik zar da bulunmaktadır ve ilacın atımı için proton itici güç kullanılmaktadır. Gram negatiflerde özellikle RND pompa sistemi ilaç direncinde önemli role sahiptir. RND pompa ailesinden AcrAB-TolC (florokinolon ve sefuroksim direnci ile ilişkili bulunmuştur), MFS pompa ailesinden MdfA ve yeni bulunan QepA (plazmid ile kodlanan florokinolon direnç geni) , SMR pompa ailesinden EmrE *E. coli*’de bulunan pompa sistemleridir (45, 46).

2.5.4. Antibiyotikleri İnaktive Eden Enzimlerin Sentezlenmesi

Antibiyotikleri değişikliğe uğratan aminoglikozid modifiye edici enzim (AME), antibiyotikleri hidroliz eden enzimlerden; kloromfenikol asetil transferaz

(CAT) (sıklıkla *S. pneumoniae*'de etkili) ve beta laktamazlar gibi birçok enzim tanımlanmıştır (29).

2.6. Beta Laktamazlar

Beta laktamaz enzimleri beta-laktam antibiyotiklerdeki dört üyeli beta-laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Bu enzimler Gram negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı geliştirdiği major defans mekanizmalarından biridir. Beta laktamazlar ilk olarak penisilinleri hidroliz etmeleriyle tanımlanmıştır. Bundan sonra her yeni beta-laktam grubu antibiyotik kullanılmasıyla bu tabloya yeni beta laktamazlar eklenmiştir (4). Oksimino sefalosporinlerin 1980'lerin başında kullanılmasıyla GSBL, 1980'lerin sonlarına doğru beta-laktam/beta-laktam inhibitörlerinin yaygın kullanımıyla inhibitör rezistan TEM enzimleri, 1990'larda sefamisinlerin kullanımıyla plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazlar, daha sonra da karbapenemlerin yaygın kullanımıyla karbapenemazlar ortaya çıkmıştır. Son yıllarda GSBL, inhibitör-rezistan beta laktamaz, AmpC-beta laktamaz ve metallo-beta laktamaz ve non metallo-beta laktamaz tipi karbapenemazlarda oldukça fazla sayıda artış gözlenmiştir. Günümüzde 890'dan fazla beta laktamaz bilinmektedir (4, 47).

Beta laktamazlar sıklıkla 2 temel yönden sınıflandırılır. Ambler'in moleküler sınıflandırılması ve Bush-Jacoby-Mederios'un fonksiyonel sınıflandırması. Ambler tarafından 1980 yılında yapılan moleküler sınıflandırmada beta laktamazlar aminoasit benzerliği ve protein homolojisine göre sınıf A, C, D serin aracılı beta laktamaz, sınıf B ise metallo-beta laktamaz olarak sınıflandırılmıştır. Bush-Jacoby-Mederios tarafından yapılan sınıflandırmada ise substrat ve inhibitör profillerine ve fonksiyonel benzerliklerine göre beta laktamazlar dört temel grup ve çok çeşitli subgruplar şeklinde sınıflandırılmıştır. Tablo 2'de 1995 ve 2009'da yapılmış Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması görülmektedir (47). Bu sınıflandırmaya göre:

Grup 1 Sefalosporinazlar

Moleküler sınıf C'de yer alır. İndüklenebilme özelliği gösteren enzimlerdir. *Enterobacteriaceae* ve bir kısım bakterilerde kromozomal olarak bulunur. Benzilpenisilinlere göre sefoksitin gibi sefamisin grubu sefalosporinlerde dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri daha iyi hidroliz ederler. Genellikle klavulanat ile inhibe edilmezler. Sınıf A sefalosporinazların aksine aztreonama yüksek afinite gösterirler. Nadir olarak sefoksitine etki göstermeyebilir, klavulanat ya da tazobaktam ile inhibe

olabilir ve seftazidimden ziyade sefotaksime direnç gösterebilir. *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* gibi birçok bakteride kromozomal AmpC enzimleri düşük düzeyde bulunmakla birlikte amoksisilin, ampisilin, klavulanat ve imipenem varlığında indüklenebilme özelliği gösterebilmektedir. Plazmid aracılı Grup1 Sefalosporinazlardan olan; CMY, ACT, ACC, DHA, FOX, MIR, LAT enzimleri 1989'dan beri bilinmekle birlikte GSBL'den daha az gözlenmektedir (47, 48).

Grup 1e sefalosporinaz, bu grubun yeni üyesidir. Aminoasitlerde meydana gelen delesyon, insersiyon ve yerdeğişimi sonucu ortaya çıkan enzim grubudur. Bu grup enzimler seftazidim ve diğer geniş spektrumlu beta laktamlara karşı oldukça fazla aktivite göstermektedir. Bu nedenle bu grup; geniş spektrumlu AmpC beta laktamaz (ESAC: Extended Spectrum AmpC Beta Lactamase) olarak tanımlanmıştır. *E. cloacae*'nin GC1enzimi, plazmid aracılı CMY-10, CMY-19, CMY-37 bu grupta bulunan enzimlerdir (47, 48).

Grup 2 Serin Beta Laktamazlar

Son yirmi yılda GSBL tanımlanmasındaki artış nedeniyle en geniş kategoriye oluşturan gruptur. Substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü Ambler sınıf A ve D'de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre alt gruplara ayrılırlar. 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar (47).

Subgrup 2a Beta Laktamazlar: Sınırlı hidrolitik aktiviteleri nedeniyle küçük bir grubu temsil etmektedir. Gram pozitif koklardan stafilokok ve nadiren enterokoklarda gözlenmektedir. Tercihen benzil penisilin, birçok penisilin türevlerini ve nitrosefini hidroliz ederler. Sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamları, benzil penisilin türevlerine göre %10'dan az hidroliz ederler (47, 49).

Subgrup 2b Beta Laktamazlar: Penisilin ve sefalotin gibi ilk kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilmektedir. Tazobaktam ve klavulanat ile güçlü şekilde inhibe edilirler. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptandır. Sıklıkla plazmid aracılı beta laktamaz olan bu grup enzimler 1970 ve 1980'li yılların başlarında tanımlanmıştır (47).

Subgrup 2be Beta Laktamazlar: Penisilin ve sefalosporin hidrolizine ek olarak sefotaksim, seftazidim ve aztreonamın bir veya bir kaçını hidroliz edici etkisi nedeniyle

GSBL olarak adlandırılırlar. İlk ve en geniş grup olan subgrup 2be; TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'den genişlemiş substrat profili ile köken almıştır. Son yıllarda *Kluyvera* türlerinde bulunan kromozomal CTX-M beta laktamazlarda bu grup içinde sıklıkla gözlenmeye başlamıştır (4, 47, 50).

Subgrup 2br Beta Laktamazlar: Klavulanata karşı anlamlı derecede direnç gösteren inhibitörlere dirençli beta laktamazlardır. Beta laktamaz inhibitörleri klinikte kullanılmaya başlandığında bu antibiyotiklere karşı hemen hiç direnç gözlenmezken, 1997 yılından itibaren bazı amoksisilin/klavulanik asite dirençli *E. coli*'ler bildirilmeye başlanmıştır (47). Günümüzde 135 TEM enzimlerinin 36'sı ve 72 SHV enzimlerinin 5'i bu özelliklere sahip enzimlerdir. Örneğin TEM-30, TEM-31 ve SHV-10 gibi. CTX-M beta-laktamazlarda bu özellikte enzim gösterilmemiştir (6). Klasik TEM enzimlerine kıyasla dar spektrumlu sefalosporinlere karşı aktiviteleri daha azdır. Bu enzimler önceleri IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV'de sıralamaya girmiştir. Örneğin; IRT-1; TEM-31, IRT-2; TEM-44, IRT-3; TEM-32, IRT-14; TEM-45 olarak yeniden numaralanmıştır. IRT'ler en sık olarak *E. coli*'de, daha seyrek olarak *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* ve *C. freundii* kökenlerinde bulunmaktadır. İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulanat ve sulbaktamla inhibisyona dirençli olmasının yanı sıra beta laktam/beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlara da dirençlidir (51, 52).

Subgrup 2ber Beta Laktamazlar: Klavulanat ile inhibisyona direnç ile birlikte geniş spektrumlu aktiviteyi birlikte bulunduran TEM grup enzimleri kapsamaktadır. Aynı zamanda CMT (complex mutant TEM) beta laktamaz olarak da adlandırılırlar. TEM-50 (CMT-1) bu gruptandır (51, 52).

Subgrup 2c penisilinaz: Benzil penisilinlerden karbenisilin ve tikarsilini en az %60 oranında hidroliz edebilen enzimlerdir. Kloksasilin veya oksasilin hidroliz özelliği ise benzil penisilinler ile kıyaslandığında %50'den azdır. Bu tip penisilinazlar genellikle klavulanat ve tazobaktam ile kolayca inhibe olurlar (47, 53).

Subgrup 2ce Beta Laktamazlar: Sefepim ve sefpiroma karşı geniş spektrumlu aktivite gösteren genişlemiş spektrumlu karbenisilinaz olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; CARB-10 gibi (53).

Subgrup 2d Beta Laktamazlar: "OXA enzimler" olarak da bilinirler. Benzil penisilinlere göre %50 daha fazla oranda oksasilin ve kloksasilini hidroliz eden enzimlerdir. Aynı zamanda karbenisilin hidrolizi de olabilir. OXA ailesinin çoğu üyeleri fonksiyonlarından ziyade aminoasit dizilimine göre tanımlanmıştır. Bu grubun birçok

enzimi NaCl ile inhibe olur. Günümüzde OXA beta laktamazlar ikinci en sık grubu oluşturmaktadır (47, 54).

Subgrup 2de Beta Laktamaz: Yeni bir subgruptur. Kloksasilin ve oksasilin ile birlikte karbapenemler dışında oksiiimino beta laktamlara karşı genişlemiş spektrumlu hidroliz aktivitesi sözkonusudur. Bu grup enzimlerin çoğu OXA-10'dan bir ile dokuz aminoasit değişimi ile gelişmiştir. OXA-11 ve OXA-15 bu grup içerisinde. Sıklıkla Türkiye ve Fransa'dan *P. aeruginosa* izolatlarında elde edilmiştir. Bu enzimlerin bulunduğu izolatlarda seftazidim direnci, sefotaksim ve aztreonam direncinden daha belirgindir. Ancak OXA-1 ve OXA-31 bulunduran izolatlarda sefepim dirençli ve seftazidim duyarlı olabilmektedir (47, 54).

Subgrup 2df Beta Laktamaz: Karbapenemaz aktivitesi olan OXA grup enzimleri kapsamaktadır. Bu subgrup enzimler genellikle kromozomal kaynaklı olarak *Acinetobacter baumannii*'de izole edilmektedir. Bu grup enzimlerden olan OXA-23 ve OXA-48 ise genellikle plazmid kaynaklı olup *Enterobacteriaceae*'de gözlenmektedir. Subgrup 2d enzimler kloksasilin veya oksasilin hidrolizine göre tanımlanmakla birlikte bu grubun sadece birkaçında bu substratlar kullanılarak test yapılabilmektedir. Örneğin OXA-50'de oksasilin hidrolizi saptanamamaktadır. OXA karbapenemazlar; karbapenemler için zayıf hidrolitik aktivite göstermekle birlikte imipenem hidrolizi meropenemden daha hızlıdır (47, 54).

Subgrup 2e Sefalosporinazlar: Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz özelliği gösterir. Klavulanat ve tazobaktamla inhibe olur. *Proteae* ailesinde bulunan indüklenebilen kromozomal sefalosporinazlar genellikle bu subgrupta gözlenmektedir. Genellikle Amp C enzimler ve/veya GSBL ile karışabilmektedir. Azteronama karşı kötü afinite göstermesi Amp C enzimlerden ayırt edici özelliğidir. Bu grup enzimlerin birçoğu GSBL olarak tanımlanabilmektedir (47).

Subgrup 2f Beta Laktamazlar: Sınıf A serin karbapenemazlardır. Karbapenemler bu grup enzimler için belirgin bir substratdır ve klavulanat'dan ziyade tazobaktam ile inaktive edilirler. Seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler, SME ve IMI-1 enzimleri tarafından iyi hidrolize edilemezler. Fakat aztreonam; GES-3 ve GES-4 haricindeki pek çok enzim tarafından hidroliz edilirler. SME familyasından IMI-1 ve NMC-1, kromozomal subgrup 2f beta-laktamazlardır. Plazmidle kodlanan 2f beta laktamazlardan KPC ve GES enzimleri özellikle Newyork ve İsrail'de çoklu dirençli Gram negatif infeksiyon salgınlarından sorumlu tutulmuştur (55).

Grup 3 Beta Laktamazlar

Karbapenemleri inaktive eden sınıf B metallo-beta-laktamazlardır. Aktiviteleri için bir ya da iki çinko iyonuna gereksinimleri olup, beta laktamaz inhibitörlere dirençlidirler. Metallo-beta laktamazlar, serin beta laktamazların aksine monobaktam dışında tüm sınıf beta laktamları hidroliz edebilme özelliğindedir. EDTA, dipikolinik asit veya 1,10-*o*-phenanthroline gibi metal şelatörler tarafından inhibe edilirler. Yapısal özelliklerine göre (B1, B2 ve B3 şeklinde) ya da fonksiyonlarına göre (subgrup 3a, 3b ve 3c şeklinde) sınıflara ayrılırlar. B1 ve B3 sınıf metallo-beta laktamazlar bir veya iki çinko iyonu bağlayabilme özelliği nedeniyle benzer iken B2 enzimi tek çinko iyonu bağlayabilme özelliğindedir. Bu grup enzimler *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bacteroides fragilis*'de kromozomal olarak bulunmaktadır. Subgrup 3a metallo-beta laktamazı plazmidlerce kodlanır. Sıklıkla nonfermenter bakterilerde ve *Enterobacteriaceae*'de bulunan IMP ve VIM enzimleri bu grup içerisindedir (56).

Grup 4 Beta Laktamazlar

Klavulanat ile baskılanmayan penisilinazları içermektedir. Diğer gruplara girmeyen ve henüz tam yapı analizleri yapılmamış enzimlerdir (47).

Tablo 2. Bush-Jacoby-Medeiros'un beta laktamaz sınıflaması (47)

Bush-Jacoby grup (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros grup (1995)	Moleküler Sınıf ve alt gruplar	Tercih edilen substrat	İnhibisyon		Enzimler
				CA veya TZB	EDTA	
1	1	C	Sefalosporinler	Yok	Yok	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Sefalosporinler	Yok	Yok	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penisilinler	Var	Yok	PC1
2b	2b	A	Penisilinler/ 1. kuşak sefalosporinler	Var	Yok	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler/ Monobaktamlar	Var	Yok	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penisilinler	Yok	Yok	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler/ Monobaktamlar	Yok	Yok	TEM-50
2c	2c	A	Karbenisilin	Var	Yok	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Karbenisilin ve sefepim	Var	Yok	RTG-4
2d	2d	D	Kloksasilin	Değişken	Yok	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	Yok	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Karbapenemler	Değişken	Yok	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Geniş spektrumlu Sefalosporinler	Var	Yok	CepA
2f	2f	A	Karbapenemler	Değişken	Yok	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Karbapenemler	Yok	Var	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Karbapenemler	Yok	Var	CphA, Sfh-1
NI	4	Bilinmiyor				

CA: Klavulanik asit, TZB: Tazobaktam, NI: 1995'de tanımlanmamış

2.7. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

2.7.1. Tanım ve Sınıflandırma

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin 1980'li yılların başında klinik uygulamaya girmesi ile birlikte antibiyotiklere karşı beta laktamaz aracılı direnç mekanizmalarında

artış gözlenmiştir. GSBL'nin kesin tanımında ortak bir karar olmamakla birlikte en yaygın kullanılan tanımı şu şekildedir: GSBL'ler karbapenem ve sefamisin haricinde penisilin, aztreonam ve tüm kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilen, aktif bölgelerinde serin bulunan ve genellikle klavulanat, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhiye olan beta-laktamazlardır. Kromozomal ya da plazmid aracılı kodlanabilen enzimlerdir. Aminoasit benzerliklerine göre TEM, SHV, CTX-M, SFO-1, PER, VEB, GES, TLA, BES ve OXA gibi farklı tipde enzimleri vardır (4, Tablo 3).

İlk plazmid aracılı GSBL 1983'de rapor edilmiştir. Bu beta laktamaz geni SHV-1'den tek nükleotit mutasyonu ile farklılaşmıştır. Günümüzde 450'den fazla GSBL mevcuttur ve tüm dünyada yaygınlaşmış durumdadır (4, 6, 57, Tablo 3).

Tablo 3. Plazmidler ile kodlanan GSBL'ler (57).

Beta laktamaz adı	İlk izole edildiği yıl	Varyant sayısı	İsmin orijini
Eski GSBL			
SHV tip	1983	>140	<u>S</u> ulf <u>h</u> ydryl <u>V</u> ariable
TEM tip	1985	>160	Hasta adı: <u>T</u> emoneira
Yeni GSBL			
CTX-M tip	1989	>65	<u>C</u> efotaximase— <u>M</u> unich
Minor GSBL			
SFO-1	1988	1	Serratia fonticola
TLA-1	1991	1	<u>T</u> lahuicas (Hindistan kabilesi)
PER	1991	3	<u>P</u> seudomonas <u>e</u> xtended <u>r</u> esistance
VEB	1996	5	<u>V</u> ietnam <u>e</u> xtended-spectrum <u>b</u> eta-lactamase
BES-1	1996	1	<u>B</u> rezilya <u>E</u> SBL*
GES	1998	9	<u>G</u> uyana <u>E</u> SBL*
BEL-1	2005	1	<u>B</u> elçika <u>E</u> SBL*
TLA-2	2005	1	TLA-1 ile %51 benzer
OXA GSBL			
OXA	1991	En az 9	<u>O</u> xacillin hidrolizi > penicillin

ESBL (Extended-Spectrum Beta Lactamase): Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz.

Son yıllarda KPC (*K. pneumoniae* karbapenemaz) tipi karbapenemazların, GES varyantı beta laktamazların ve OXA karbapenemaz ve sefalosporinazların artan sayısı ve plazmid aracılı aktarımı nedeniyle klinik uygulamada hekimlere faydalı olabilmek için GSBL enzimleri yeniden tanımlanmaya çalışılmıştır. GSBL enzimlerinin sıklıkla

diğer beta-laktam olmayan antibiyotiklere karşı direnç genlerinin aynı transfer edilebilen genetik elemanlar ile birlikte taşınması konunun önemini gittikçe artırmaktadır (58). Bütün bu sebeplerden dolayı GSBL;

1- GSBL_A: Klasik fonksiyonel sınıflandırmaya göre grup 2be beta laktamazlardır.

2- GSBL_M: GSBL_{M-C}; Plazmid aracılı AmpC tip GSBL ve GSBL_{M-D}; OXA-GSBL olarak iki alt gruba ayrılır.

3- GSBL_{CARBA}: Karbapenemlere karşı hidrolitik aktivite gösteren GSBL olarak sınıflandırılmıştır (58).

Günümüzde karbapenemaz beta laktamazı ile ilişkili olarak tamamiyle yeni bir görüş; karbapenemleri hidroliz eden beta laktamazların acil tanımlanması gerekliliğidir. Bu nedenle karbapeneme karşı hidrolitik aktivite gösteren GSBL, “GSBL_{CARBA}” olarak tanımlanmıştır. Bu grup kendi içinde daha dikkat çekici özellikte olacak şekilde A,B,D şeklinde ayrılmıştır. Tablo 4’de klinik olarak önemli beta laktamazlar GSBL_A, GSBL_M ve GSBL_{CARBA} şeklinde üç gruba ayrılmıştır. Bu üç grup klinisyenler için enfeksiyon kontrol önlemleri ve klinik kullanım açısından daha nitelikli bir sınıflandırma olmuştur (58).

Tablo 4. GSBL'lerin sınıflandırılması (58).

Geniş spektrumlu sefalosporinlere ve/veya karbapenemlere karşı hidrolitik aktivite gösteren beta laktamazlar			
Beta laktamaz sınıfları	GSBL_A	GSBL_M	GSBL_{CARBA}
	Prevalansı yüksek olan GSBL_A	GSBL_{M-C} (Plazmid aracılı AmpC)	GSBL_{CARBA-A}
	CTX-M TEM SHV VEB PER	CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	Prevalansı düşük olan GSBL_A	GSBL_{M-D} (OXA-GSBL)	GSBL_{CARBA-B} (MBL)
	GES-1-3-7-9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT ^a	OXA-10-grup OXA-13-grup OXA-2-grup OXA-18 OXA-45	IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1
			GSBL_{CARBA-D} (OXA karbapenemaz)
			OXA-23-grup OXA-24-grup OXA-48 ^b OXA-58-grup
Tanımlama için yapılacak çalışmalar	Geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı değil Ve klavulanat ile sinerji	Geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı değil GSBL _{M-C} ; fenotipik metodlar ile saptanır ya da GSBL _{M-D} ; Genotipik metodlar ile saptanır	Geniş spektrumlu sefalosporinlere ve en az bir karbapeneme dirençli GSBL _{CARBA} ; fenotipik ya/ya da genotipik metodlar ile saptanır

^a; Klavulanat ile inhibisyona dirençli.

^b; OXA-48 üreten izolatlar in vitro sefalosporinlere duyarlı olabilir.

2.7.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Enzim Tipleri

SHV Beta Laktamazlar

P-chloromercuribenzoat'ın substrat ilişkili olarak SHV aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle “Sulfhydryl Variable” olarak adlandırılırlar. Bu grup enzimlerin öncüsü olan SHV-1 beta-laktamaz enzimi ilk olarak 1983'de Almanya'da *Klebsiella ozaena*'da izole edilmiştir. SHV-1 beta-laktamazlar sıklıkla *K. pneumoniae* bakteri kromozomunda yapısal olarak bulunmaktadır ve plazmid aracılı ampisilin direncinin %20'sinden sorumlu enzimlerdir (4). İki temel değişiklik ile GSBL aktivitesi ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birincisi 238. pozisyondaki serin aminoasit değişikliği ile seftazidimin, ikincisi de 240. pozisyondaki lizin aminoasit değişikliği ile sefotaksim hidrolizinin sağlanmasıdır (59). SHV türevi beta laktamazların çoğu GSBL fenotipi gösterirken, SHV-10 inhibitörlere dirençli beta laktamaz fenotipi göstermektedir. SHV-10, SHV-5 türevi beta laktamaz olmakla birlikte aynı zamanda 130. pozisyonda serin yerine glisin aminoasit değişikliği göstermektedir (60). SHV beta laktamazların 143 kadar varyantı vardır. Bunların 40 kadarı GSBL fenotipi gösterir. İnhibitörlere direnç fenotipi gösteren SHV türevi-beta laktamazlar ise SHV-10,-26,-49,-56 ve-84'dür. İzo-elektrik noktaları 7 ile 8.2 arasında değişir (6). SHV tip GSBL'ler aynı zamanda *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır (4, 50).

TEM Beta Laktamazlar

TEM-1 ilk olarak 1965'de Yunanistan'da “Temoneriae” adlı hastadan izole edildiği için bu adı almıştır. TEM beta laktamazlar sıklıkla *E. coli* ve *K. pneumoniae*' de ve diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde gözlenmektedir. TEM tip GSBL'ler TEM-1 ve TEM-2 köken alır. *E. coli*'de ampisilin direncinin %90'dan fazlasından TEM-1 enzimi sorumludur. Bu enzim aynı zamanda *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'de ampisilin ve penisilin direncinin artışından sorumludur. TEM-1 enzimi; penisilinleri ve birinci kuşak sefalosporinlerden sefalotin ve sefaloridini hidroliz eder. TEM-1'in ampisilin hidroliz etkisi karbenisilin, oksasilin ve sefalotinden daha fazladır. Geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı etkisi önemsiz düzeydedir. Klavulanik asitle inhibe olur. TEM-2, TEM-1'den tek aminoasit değişikliği ile oluşan ilk türevidir. TEM-1 ile aynı hidrolitik profile sahip olmakla birlikte farklı izoelektrik noktası (5.6) mevcuttur (4, 50). TEM beta laktamazların 200'e yakın varyantı mevcut olup 100'ü aşkın tipi GSBL fenotipi göstermektedir (6). TEM-3 beta laktamazı GSBL fenotipi gösteren ilk beta laktamaz olarak rapor edilmiştir. İlk olarak Fransa'da *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır.

Sefotaksime karşı artmış etkinlik göstermesi nedeniyle CTX-1 olarak adlandırılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar neticesinde TEM-2'den iki aminoasit değişimi ile farklılaşmış olduğu saptanmıştır (61). TEM enziminde sınırlı sayıda aminoasit değişimi ile hidroliz ettikleri substrat profili seftazidim ve seftriakson gibi oksiminio sefalosporinlere ve izo-elektrik noktaları ise 5.2 ile 6.5 aralığına kayar. Genellikle Glisin 238 serin, Glutamat 240 lizin, Arginin 164 serin ya da histidin ve Glutamat 104 lizin pozisyonu en sık gözlenen aminoasit değişiklikleridir (4, 50).

Yeni varyantların çoğu GSBL fenotipi göstermekle birlikte inhibitörlere direnç fenotipi gösteren türevleri de mevcuttur. Bazı TEM beta laktamazların beta-laktam inhibitörlerini hidroliz özelliği artmıştır. Bu enzimler GSBL fenotipi göstermeyen, geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı hidrolitik aktivitesi önemsiz düzeyde ve beta laktamaz inhibitörlerine karşı artmış hidroliz gösteren TEM tipi enzimlerdir. Bununla birlikte bazı TEM beta laktamazların mutant formları üçüncü kuşak sefalosporinleri ve beta laktamaz inhibitörlerini hidroliz özelliği gösterebilmektedir. Bu tipde beta laktamazlar “Compleks Mutant TEM” (CMT-1'den -4'e kadar) olarak adlandırılır (51, 52).

CTX-M ve TOHO Beta Laktamazlar

Sefotaksimi belirgin derecede hidroliz ettikleri için CTX-M (Cefotaximase—Munich) olarak adlandırılır. İlk olarak 1989 yılında Japonya'da *E.coli* izolatında FEC-1 olarak tanımlanmıştır. CTX-M tip beta laktamazlar esasen non patojenik, çevresel izolat olan *Kluyvera* türlerinin kromozomal yapısında bulunmakla birlikte, plazmidler aracılı aktarımı sayesinde *Salmonella* serotip Typhimurium, *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de yaygınlığı artmıştır. Bu grup enzimler *Serratia fonticola*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris* ve *Citrobacter koseri*nin kromozomal sınıf A enzimleri ile yakın ilişkili beta laktamazlardır. CTX-M enzimleri en yaygın plazmid aracılı TEM ve SHV beta laktamazlarla %40 ya da daha az homoloji gösterir (4, 50, 62). Günümüzde CTX-M familyasının 124 kadar varyantı vardır (6).

CTX-M beta laktamazları bulunduran *E. coli* izolatları genellikle aminopenisilinlere (ampisilin ve amoksisilin), karboksi penisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin), üreidopenisilinlere (piperasilin) ve dar spektrumlu sefalosporinlere (sefaloridin, sefalotin ve sefuroksim) yüksek düzeyde dirençlidir. Sefoksitin ve karbapenem (imipenem ve meropenem) için duyarlılıkları değişmektedir. Sefotaksim, seftriakson ve aztreonam MİK düzeyleri oldukça artmıştır. Seftazidim MİK düzeyleri sıklıkla duyarlı aralıkta saptanmakla bazı varyantlarda anlamlı derecede artış göstermektedir. Özellikle CTX-M-15, CTX-M-16 ve CTX-M-27 gibi enzimlerde

Asp240Gly değişimi ile seftazidim MİK dūzeyinde yaklaşık sekiz katlık artışa neden olmaktadır (63, 64).

CTX-M enzimleri beş major gruba ayrılmıştır:

CTX-M-1 grup; CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, FEC-1, CTX-M-22, CTX-M-23 ve CTX-M-28,

CTX-M-2 grup; CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 ve Toho-1(CTX-M-44),

CTX-M-8 grup; CTX-M-8 ve CTX-M-40,

CTX-M-9 grup; CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 ve Toho-2 (CTX-M-45), CTX-M-24,

CTX-M-25 grup; CTX-M-25 ve CTX-M-26 (62).

K. ascorbata'da bulunan doğal CTX-M enzimi KLUA olarak tanımlanır ve CTX-M-2 gruba dahil edilmiştir. *K. ascorbata*'ya ait KLUA-2 enzimi, *Salmonella* serotip Typhimurium'da bulunan CTX-M-5 ile de benzer bulunmuştur. *K. georgiana*'da bulunan KLUG-1 beta laktamazı CTX-M-8 enziminden farklılaşmıştır (62).

TOHO-1 ve TOHO-2 yapısal olarak CTX-M beta laktamaz ile iliřkilidir. TOHO; Tokyo, Toho Őniversitesinde yatan hastadan izole edilen *E. coli* beta laktamazına verilen isimdir. TOHO-1 ve TOHO-2 enzimlerin hidrolitik aktivitesi seftazidimden ziyade sefotaksime karřıdır. TOHO-2 beta laktamazı; CTX-M-2 ile %76.3, Toho-1 ile %76.2 ve SHV-1 beta laktamazı ile %55.9, TEM-1 beta-laktamazı ile %47.5 benzerlik gōsterir. TOHO-1; CTX-M-44, TOHO-2 ise CTX-M-45 olarak yeniden adlandırılmıřtır (65, 66). Gūnūmūzde CTX-M tip beta laktamazlar tūm dūnyada dramatik bir řekilde artmıřtır. CTX-M tip GSBL özellikle toplum kaynaklı izolatlarda sayısı gittikēe artmaktadır. Dūnyada özellikle Gūney Amerika, Uzak doęu ve Doęu Avrupa gibi Őlkelerde olmak ũzere klonal yayılımı gōsterilmiřtir (62).

OXA Beta-Laktamazlar

Sıklığı gittikēe artan GSBL ũyesidir. Gūnūmūzde OXA familyasının 232 kadar varyantı vardır (6). OXA tip enzimler esasında benzil penisiline gōre %50 daha fazla, oksasilin ve kloksasilini hidroliz ettikleri iēin bu adı almışlardır. Sodyum klorid'le gūēlū bir şekilde inhibe edilirken klavulanat tarafından inhibisyonu zayıftır. Oksasilin hidroliz eden beta laktamazlar Ambler sınıflamasına gōre D sınıfında olmakla birlikte sınıf A ve C beta-laktamazlarda bulunan serin bōlgesini taşımaktadırlar. Molekūler sınıf D ve fonksiyonel grub 2d olarak sınıflandırılırlar. OXA tip beta laktamaz familyası genotipik ũzelliklerinden ziyade fenotipik ũzelliklerine gōre tanımlanmıştır. Bu nedenle bu

familyanın üyeleri diğer tür GSBL ile yaklaşık %16 sekans homolojisi göstermektedir. Kendi için de bu tip beta laktamazlar; dar spektrumlu OXA, geniş spektrumlu OXA ve karbapenemaz üreten OXA beta laktamazlar olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (4, 54).

a. Dar Spektrumlu OXA Enzimler

Subgrup OXA-1: Plazmid ve integron lokalizasyonlu bulunan bu beta-laktamazlar sıklıkla amino ve üreido penisilinleri anlamlı olacak şekilde ve dar spektrumlu sefalosporinleri ise zayıf olarak hidroliz edebilmektedir. Sıklıkla ampisilin dirençli *E. coli*, *S. flexneri* ve *Salmonella* spp. izolatlarında saptanmıştır. OXA-1 geni özellikle CTX-M geni olmak üzere GSBL genleri ile birlikte aynı plazmidde saptanmıştır. OXA-1'den yedi aminoasit değişimi ile OXA-47, iki aminoasit değişimi ile OXA-31 gibi varyantları elde edilmiştir (54).

Subgrup OXA-2: OXA-1 grup ile %30 aminoasit benzerliği gösteren bu grubun OXA-3, OXA-15, OXA-21, OXA-32, OXA-34, OXA-36 ve OXA-53 gibi varyantları mevcuttur. Bu tip beta laktamaz genleri; çok çeşitli Gram negatif ve *Corynebacterium amycolatum* gibi Gram pozitif türlerde Sınıf 1 integron ile ilişkili gen kasetlerinde saptanmıştır (54).

Subgrup OXA-10: Esasında seftazidim, sefamisin ve karbapenem dışında aztreonam, seftriakson ve sefotaksimi daha düşük hidroliz edebilen enzimlerdir. Sıklıkla *P. aeruginosa*'da tanımlanmıştır. OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-28, OXA-35 ve OXA-74 gibi varyantları geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz özelliği gösterir (54).

b. Geniş Spektrumlu OXA Enzimler: Dar spektrumlu OXA enzimlerden köken alırlar. OXA-15 ilk olarak ülkemizde *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. OXA-2'den 150.ci pozisyonda Asp yerine Gly değişimi ile türemiştir. OXA-32, diğer OXA-2 varyantı geniş spektrumlu hidroliz özelliği gösteren enzimdir. OXA-10'dan köken alan varyantlar ise OXA-14,-16,-17 gibi enzimlerdir (54).

c. Karbapenem Hidroliz Eden OXA Enzimler: Sıklıkla *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direncinin artmasından sorumlu tutulmuştur. OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 gibi enzimler bu gruptandır. OXA-25, OXA-26, OXA-40 ve OXA-72 diğer karbapenem hidroliz eden OXA varyant enzimlerdir. Karbapenem hidroliz özelliği olan diğer bir enzim OXA-48 ülkemizde karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır. Bu enzimin ayırteci özelliği dar spektrumlu penisilinleri ve imipenemi hidroliz etmekle birlikte geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı hidroliz özelliğinin olmamasıdır (67).

PER Beta Laktamazlar

PER-1 ilk kez 1991 yılında Paris'te bir Türk hastanın idrar örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmış ve 1993 yılında Nordmann ve arkadaşlarınca tanımlanmıştır. TEM-SHV grubu GSBL'ler ile %27 oranında homoloji göstermektedir. Sefamisin ve karbapenem dışında penisilin, sefotaksim, seftazidim ve aztreonama direnç gösterir. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam ile güçlü bir şekilde inhibe edilirler. Sınıf A grubunun tipik özelliğini göstermekle birlikte üç boyutlu yapısı incelendiğinde omega bağ yapısındaki yeni sarmal nedeniyle subgrup şeklinde ifade edilmiştir. PER-2 enzimi, PER-1 ile %86 oranında homoloji gösterir. *Salmonella* serovar Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *V. cholerae* O1 El Tor'da rapor edilmiştir. PER beta laktamazın 1-7 varyantı mevcuttur (6). PER-3, PER-4, PER-5; PER-1 ile %99 amino asit benzerliği gösterir ve *Aeromonas punctata*, *P. vulgaris* ve *A. baumannii* izolatlarında saptanmıştır (4, 50, 68).

VEB Beta Laktamazlar

İlk olarak 1996'da Fransa'da Vietnamlı bir hastada bulunduğu için “Vietnam Extended-spectrum Beta laktamaz” olarak adlandırılmıştır. Diğer türlere sınıf 1 integron gen kaseti ya da plazmid aracılı aktarımı sözkonusudur. VEB-1 beta laktamazı; PER-1 ve PER-2 ile %38 oranında homoloji gösterir. VEB-1 amoksisilin, tikarsilin, piperasilin, sefotaksim, seftazidim ve aztreonama yüksek düzeyde dirençlidir ve klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam ile aynı derecede inhibe edilirler (69). VEB-1; 1a,1b, 2, 3, 4, 5, 6,7 olacak şekilde tek nokta mutasyonla birbirinden farklı 8 farklı varyantı vardır. Diğer beta laktamazlar gibi *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde saptanmıştır (6, 70).

GES Beta Laktamazlar

İlk olarak Fransa'da *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır. Ambler sınıf A GSBL hidroliz profiline benzer şekilde sefamisin ve karbapenem dışında penisilin ve geniş spektrumlu sefalosporinlere aktivite gösterir. Tazobaktam, klavulanat ve imipenemle inhibe olur. Birçok GSBL'nin aksine GES-1 aztreonamı hidroliz edemez (4, 71). GES tip GSBL (aynı zamanda IBC olarak adlandırılır) *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi Gram negatif basillerde artarak rapor edilmektedir. Günümüzde 20 kadar varyantı mevcuttur (6). GES varyantları 2-bç'lik değişim (Gly170As) nedeniyle karbapenemleri hidroliz eder ve inhibitörlere duyarlılığı azalır (71).

2.7.3. Nadir Gözlenen GSBL Enzimleri

TLA-1: Meksika’da bir hastadan izole edilen bir *E. coli* kökeninde bulunmuştur. İmipenem ve sefoksitin dışında geniş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz eder. Klavulanat ve sulbaktam ile daha az, tazobaktam ile daha güçlü olacak şekilde inhibe edilir. Plazmid aracılı aktarımı söz konusudur. CME-1 ile %50 oranında aminoasit homolojisi gösterir. VEB ve PER enzimleri ile %40 homoloji gösterir. Meksika’da plazmid aracılı SHV-5 ve TLA-1 geni bulunduran GSBL üreten *K. pneumoniae* suşu nozokomiyal bakteriyemi ve üriner infeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir (72, 73).

TLA-2: Almanya’da 2002’de atık sulara bulunan tanımlanmayan bir bakteri türünde izole edilmiştir. TLA-2 Ambler sınıf A beta laktamazdır. CGA-1 enzimini taşıyan *Chryseobacterium gleum* ile %52 benzerlik gösterir. *E. coli* TLA-1’i ile %51 benzerlik gösterir. TLA-2 plazmid aracılı kodlanmaktadır. Penisilinlerden ziyade geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı katalitik aktivite gösterir. Beta laktamaz inhibitörlerine karşı etkili değildir. TLA-2 beta laktamazın klinik materyellerdeki yaygınlığı ile ilgili henüz yeterince veri yoktur (74).

SFO-1: 1988’de *Serratia fonticola* kökeninde saptanan az rastlanan bir GSBL türüdür. 1999’da Japonya’da *E. cloacae*’da izole edilmiş ve A sınıfı beta laktamazlara dahil edilmiştir, sentezi imipenem tarafından indüklenir. SFO beta-laktamazı kodlayan geni taşıyan plazmid aynı zamanda Amp R düzenleyici genini de taşır. SFO-1 beta laktamazlar sefamisinleri hidrolize edemez ve klavulanik asitle kolayca inhibe olabilirler. Aminoasit sekans çalışmalarına göre *S. fonticola* SFO-1 beta laktamazı; *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *C. diversus*’un kromozomal beta laktamazı ve plazmid aracılı MEN-1 ve TOHO-1 beta laktamazı ile %69.3’den fazla benzerlik gösterdiği saptanmıştır (75, 76).

BES-1: Brezilya’da *S. marcescens* kökeninde 1996 yılında izole edilmiştir. Aztreonam ve sefotaksime karşı aktivitesi oldukça yüksektir. Ancak seftazidim ve aztreonam aktiviteside oldukça yüksek bulunmuştur. BES-1 beta-laktamazı plazmidlerce kodlanır. Ambler sınıf A ve fonksiyonel grup 2be beta laktamazlar içinde yer alır. CTX-M grup-1 beta laktamazlar ile %48 oranında aminoasit benzerliği gösterir. Klavulanat ile inhibe edilmekle birlikte tazobaktama karşı düşük derecede aktivitesi söz konusudur (77).

BEL-1: Belçika’da *P. aeruginosa* kökeninde 2004’te izole edilmiştir. Diğer sınıf A beta laktamazlar ile zayıf ilişkilidir. GES-1 GSBL ile %50, CTX-M grup ile %40, BES-1 ile %8 oranında aminoasit benzerliği gösterir. Geniş spektrumlu sefalosporinler

ve aztreonamı anlamlı şekilde hidroliz eder. BES-1'e benzer şekilde klavulanat, sefoksitin, moksalaktam ve imipenem ile iyi inhibe edilirler. Tazobaktam kötü inhibitördür. BEL-1 geni kromozomal bir enzimdir ve üç gen kaseti içeren sınıf 1 integronda bulunmuştur. Yakın zamanda yapılmış çalışmalara göre BEL-1 geni Belçika'da toplum ve hastane kaynaklı *Pseudomonas* salgınlarına neden olmuştur. Yine Belçika'da tek aminoasit değişikliği ile *P. aeruginosa* izolatında BEL-2 geni saptanmıştır (78, 79, 80).

2.7.4. GSBL'nin Klinik Önemi

GSBL üreten Gram negatif basillerin saptanması; uygun tedavi ve infeksiyon kontrol önlemleri açısından önemlidir. GSBL üreten organizmaların neden olduğu infeksiyonlar *in vitro* duyarlı olsalar bile *in vivo* sefalosporinle tedavi edilen olgularda başarısız sonuçlar alınabilmektedir (81). Bu durumdan GSBL üreten izolatlarda gözlenen inokulum etkisi sorumlu tutulmaktadır. İnokulum etkisi; *in vitro* 10^5 /ml bakteri yoğunluğunda ölçülen disk difüzyon ya da breakpoint düzeylerinin, bakteri yoğunluğunun 10^7 /ml'ye çıktığında sefalosporinlerin duyarlı durumdan dirençliye kayması olarak tanımlanmaktadır (82).

2.7.5. GSBL'leri Saptama Yöntemleri

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) *K. oxytoca*, *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatları için rutin olarak GSBL tarama ve doğrulama testlerinin yapılmasını önermektedir (83).

Ancak 2010 yılında CLSI'da GSBL'ler ile ilgili bir takım değişiklikler yapılmıştır. Buna göre GSBL taranması ve saptanması; sadece epidemiyolojik çalışmalar ve infeksiyon kontrol önlemleri açısından klinisyenin isteğine bırakılmış ve beta laktam antibiyotik Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) breakpoint ve disk difüzyon yöntemine göre zon çapları açısından değişiklikler yapılmıştır (84).

A. GSBL Tarama Testleri: CLSI, GSBL tarama testleri olarak disk diffüzyon yöntemi ve dilüsyon yöntemlerinin yapılmasını tavsiye etmektedir.

Disk diffüzyon yöntemi: Antibiyotik diskleri olarak sefpodoksim (10 µg), seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve seftriakson (30 µg) kullanılır. *E. coli* için Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerinde yapılan disk diffüzyon testi sonucunda sefpodoksim ≤ 17 mm, seftazidim ≤ 22 mm, sefotaksim ≤ 27 mm,

aztreonam ≤ 27 mm, seftriakson ≤ 25 mm inhibisyon zonu oluşturmussa bakterinin GSBL üretimi açısından şüpheli olduğu anlaşılır ve doğrulama testleri yapılır (83).

Dilüsyon yöntemleri: “Mikroplak” ya da tüpte katyon katkılı Mueller-Hinton buyyon (MHB) ile yapılan dilüsyon testleri ile elde edilen MİK değerlerinin seftazidim, seftriakson, aztreonam ve sefotaksim için ≥ 2 µg/ml, sefpodoksim için ise ≥ 8 µg/ml (*Proteus* için ≥ 2 µg/ml) olarak saptanması durumunda bakterinin GSBL üretimi açısından şüpheli olduğu anlaşılır ve doğrulama testleri yapılır (83).

B. GSBL Fenotipik Doğrulama Testleri:

Sefalosporin/Klavulanik Asit Kombinasyon Diskleri: CLSI önerisine göre sefotaksim (30µg) ve seftazidim (30µg) diskleri, klavulanik asitle (10µg) ve tek başına kullanılmaktadır. MacFarland 0.5 bulanıklığındaki mikroorganizma süspansiyonu MHA plağına inoküle edildikten sonra diskler arası 25-30 mm uzaklık olacak şekilde diskler yerleştirilir. 37 °C’de 18 saat inkübasyondan sonra zon çapları ölçülür. Diskler arası mesafede: seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit ve sefotaksim ve sefotaksim/klavulanik asit zon çapında 5 mm ve daha fazla artış izolatin GSBL üretimini doğrular (83). Sadece seftazidimin kullanımı CTX-M üreten izolatları saptayamaması nedeniyle önerilmemektedir (4).

Sıvı Mikrodilüsyon: Sıvı mikrodilüsyonda seftazidim (0.25-128 µg/ml), seftazidim-klavulanik asit (0.25/4-128/4 µg/ml), sefotaksim (0.25-64 µg/ml) ve sefotaksim-klavulanik asit (0.25/4-64/4 µg/ml) kullanılır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 3 dilüsyon (8 kat) ve daha fazla azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (4, 50, 83).

Fenotipik Doğrulama Testlerinde Yanlış Pozitif ve Negatif Sonuçlar: Fenotipik doğrulama testleri genotipik testler ile kıyaslandığında oldukça yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip olmakla birlikte yanlış pozitif ve negatif sonuçlar verebilmektedir. Örneğin;

-*K. pneumoniae* veya *E. coli*’de aşırı miktarda sentezlenen SHV-1 enzimi; GSBL olmamasına rağmen doğrulama testlerinde yanlış pozitif sonuç verebilir.

-AmpC beta laktamaz ve GSBL birlikte bulunduğu izolatlarda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu durumdan AmpC beta laktamazın beta laktam inhibitörlere karşı artmış hidrolizi sorumlu tutulmaktadır.

-Tarama ve doğrulama testleri için kullanılan standart inokulum miktarındaki 0.5 log’luk düşüklük yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (4,50).

2.7.6. GSBL Saptanmasında Kullanılan Diğer Yöntemler

Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST): GSBL salgılayan suşların saptanması için klavulanik asidin bu enzimlerin aktivitesini inhibe etmesi temeline dayanan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. CLSI doğrulama test olarak önermemekle birlikte Jarlier ve ark. tarafından 1988’de ilk tanımlanan fenotipik doğrulama testidir. Bu yöntemde 0.5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA besiyerine disk difüzyon yöntemine göre inoküle edilir. Besiyerinin merkezine amoksisilin-klavulanik asit diski yerleştirilir. Etrafına disk merkezleri arası uzaklık konusunda tam bir standardizasyon olmamakla birlikte 25-30 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam ve sefpodoksim diskleri yerleştirilir. 35°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra, sefalosporinlerin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL üretimi olarak değerlendirilir, aksi durum ise GSBL üretiminin olmadığına göstergesidir. Bu yöntem ucuz ve uygulanabilirliği kolay olmakla birlikte kromozomal sefalosporinaz üreten GSBL’i saptamadaki yetersizlik, klavulanat ile inhibisyonun bazı GSBL’lerde olmaması, diskler arası uzaklığın standardize edilmemesi nedeniyle duyarlılığı azalabilmektedir. Duyarlılığı artırmak için diskler arası uzaklığın 20 mm’ye indirilmesi tavsiye edilmektedir (85, 86).

Disk Replasman Yöntemi: Casals ve Pringler tarafından 1990’da tanımlanmıştır. Bu yöntemde test edilecek izolat MHA inoküle edilir. 3 adet amoksisilin/klavulanik asit diski yerleştirilir, oda ısısında 1 saat bekledikten sonra bu antibiyotik diskleri besiyerinden alınır, kaldırılan disk yerine sefotaksim, seftazidim, aztreonam diskleri ve eş zamanlı olarak kontrol sefalosporin kontrol diski yerleştirilir. Bu disklerin her biri birbirinden 30 mm uzaklıkta olmalıdır. Amoksisilin/klavulanik asit diski kontrol sefalosporin disk zon çapı ile karşılaştırılır. 5 mm ve daha fazla artış pozitifliği gösterir. Yoğun çalışan laboratuvarlarda uygulanmasının zor olması yöntemin dezavantajıdır (4, 50).

Klavulanik Asit Eklenmiş Müller-Hinton Agar: Ho ve ark. tarafından CLSI’nın önerdiği standart disk difüzyon yönteminin modifiye edilmesi ile tanımlanmıştır. MHA 50°C su banyosunda soğuduktan sonra 4 mg/L klavulanik asit eklenir. 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan test edilecek organizma standart disk difüzyon yöntemine göre inoküle edilir. 30 µg’lık seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam diskleri birbirinden 25-30 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilir, aynı işlem klavulanik asit içermeyen MHA’da uygulanır. Bir gecelik inkübasyonun ardından

iki besiyeri arasındaki beta-laktam antibiyotik zon çapı ölçülür. 10 mm ve daha fazla fark GSBL pozitifliği olarak değerlendirilir. Seftazidim için testin duyarlılığı %93–96, özgülüğü %100'dür. Dört antibiyotiğin birlikte kullanıldığı testlerde duyarlılık %100 bulunmuştur. İnhibitörlere dirençli GSBL'yi ÇDST ve E test'de olduğu gibi saptayamaması dezavantajdır (87). Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken nokta 72 saatten sonra klavulanik asidin etkinliğinin azalması nedeniyle klavulanik asit içeren besiyerinin hazırlandıktan hemen sonra kullanılmasıdır (4, 50).

Üç Boyutlu Test: Thomson tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde 0.5 McFarland yoğunluğundaki mikroorganizma MHA inoküle edildikten sonra agarda sirküler bir yarık açılır, bu yarığa test edilen organizmanın 10^9 - 10^{10} cfu inokulumu pipetle yerleştirilir ve yarıktan 3 mm uzağa beta-laktam antibiyotikler dizilir. 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra yarık etrafındaki zonda bozulma, zonda devamsızlık veya inoküle edilen yarığın kenarında ayrı koloni oluşumu GSBL üretildiğini gösterir. Eğer inhibisyon zon çapı küçükse veya yoksa ek bir indirekt teste ihtiyaç vardır, indirekt testle beraber yapılabilirse bu yöntem çift disk sinerji testinden daha duyarlıdır. Fakat bu yöntemin diğer yöntemlere göre uygulanabilirliği düşüktür (4, 86, 87).

E Test: GSBL üretiminin fenotipik taranması ve doğrulanmasında kullanılır. Antibiyotik içeren plastik striplerdir. Test stripleri bir ucunda seftazidim (MİK test aralığı: 0.5-32 µg/ml), diğer ucunda seftazidim/klavulanik asit (MİK test aralığı 0.5/4-32/4 µg/ml) içermektedir. Aynı şekilde sefotaksim ve sefotaksim/klavulanik asit stripleri de bulunmaktadır. Bakterilerin bir gecelik taze kültürlerinden hazırlanan 0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonları MHA besiyerine ekilir. E test şeritleri besiyeri üzerine yerleştirilir. 35°C'de 18–20 saat inkübe edilir. Sefalosporin/klavulanik asit MİK değerinin sefalosporin MİK değerine oranında 8 kat ve daha fazla azalması GSBL varlığını gösterir. Sefotaksim-klavulanik asit striplerinde klavulanik asidin diğer tarafa difüze olması nedeniyle stribin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir. Sensitivitesi %87 ile %100, spesifisitesi %95-%100 arasında değişmektedir. ÇDST kadar duyarlı olmaması nedeniyle diğer yöntemler ile doğrulanması gerekmektedir. Son zamanlarda artış gösteren CTX-M tip enzimlerinin saptanması amacıyla Sefotaksim E test striplerinin kullanılması tavsiye edilmektedir (4).

Otomatize Sistemler

Vitek GSBL kartları (bioMerieux, Fransa): FDA (Food Drug Administration) tarafından onaylı sistemdir. Seftazidim, sefotaksim, seftazidim/klavulanik asit ve

sefotaksim/klavulanik asit MİK değerlerine göre GSBL tanımlanır. Bu yöntemin sensitivite ve spesifisitesi %90'nın üzerindedir. Moleküler metodlar ile uyumlu olacak şekilde ortalama 8 saat gibi sürede sonuç verebilmektedir. AmpC tip beta laktamaz ve GSBL'nin aynı anda üretimi durumunda yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli* dışındaki izolatlarda GSBL saptama güvenilirliği bilinmemektedir (4,50).

BD Phoenix otomatize sistem: Becton Dickinson Biosciences (Sparks, Md) tarafından piyasaya sürülmüştür. Altı saat gibi sürede identifikasyon ve duyarlılık testleri sonuçlanabilmektedir. Sefpodoksim, seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve sefotaksim /klavulanik asit MİK değerlerine bakılabilmektedir. *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* ve *Klebsiella türleri* ve *E. coli* gibi bakterilerde GSBL üretimini moleküler metodlar ile uyumlu olacak şekilde %98 sensitivite ve %98.7 spesifisitede saptamaktadır (4, 50).

Microscan panelleri: Dade Behring MicroScan (Sacramento, Calif.) tarafından mikrodilüsyon antibiyotik duyarlılık testleri için dehidrate paneller şeklinde üretilmiştir. Seftriakson, sefotaksim, aztreonam, sefpodoksim ve seftazidim gibi antibiyotik MİK değerlerine bakılmaktadır. CLSI'nın tavsiye ettiği GSBL tarama kriterlerine uygun konsantrasyonlardaki üremeyi saptayabilen sistemlerdir. Bu sistem özellikle *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* için tavsiye edilmiştir (4, 50).

2.7.7. Moleküler Yöntemler

GSBL'ler ilk yıllarda enzime ait izoelektrik noktaların tayini ile tanımlanmakta idi. Sonraları SHV, OXA ve CTX-M familyalarına ait benzer özellikler ve 90 TEM tip beta laktamazların benzer izoelektrik noktalarına sahip olması izoelektrik noktalar ile GSBL tanımlamayı olanaksız kılmıştır (88). GSBL'leri tanımlamada kullanılan moleküler yöntemler şunlardır;

DNA prob ve oligotiplendirme yöntemi: Beta laktamaz genlerinin tanımlanmasında kullanılan ilk metodlardandır. Yoğun laboratuvarlar için kolay ve çok yaygın kullanılan moleküler metoddur. Oligonükleotit primerleri gen bankasından seçilir. Beta laktamaz genlerine spesifik oligonükleotit primerleri ile hibridizasyon sonucu beta laktamaz genleri tanımlanır (89, 90).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP): Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, restriksiyon endonükleazlar, çift zincirli DNA'nın restriksiyon bölgeleri olarak bilinen

spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir. Elde edilen DNA parçaları elektroforez yapılarak birbirinden ayrılır. RFLP yöntemi, enzimin kesim bölgesindeki değişiklikler nedeniyle ortaya çıkan nokta mutasyonların saptanmasında hızlı ve basit bir yöntemdir (88, 91).

PZR-Tek Zincirde Konformasyon Polimorfizmi (PRR-SSCP): Amplifiye DNA'daki sekans farklılıklarının tanımlanmasında kullanılan basit ve güçlü bir metoddur. Hedef nükleik asit radyoaktif ya da radyoaktif olmayan primerler ile işaretlendikten sonra PZR ile amplifiye edilir. 95°C 'de 2 dk olacak şekilde denatüre edilen amplifiye ürünler akrilamid jelde elektroforeze tabi tutulur. Farklı formasyon oluşturan mutasyona uğramış tek iplikçikli DNA'lar farklı jel paterni ile ayrt edilir (88, 92).

Ligaz Zincir Reaksiyonu (LZR): Bu yöntemde primerlerden amplikon üretmek yerine, problemlerin amplifikasyonu sağlanır. PZR'de olduğu gibi termal döngü cihazına ihtiyaç duyulur. Denatürasyon işleminden sonra kalıp tek zincirli DNA üzerindeki hedef dizilere peşpeşe yerleşen oligonükleotit problemler termostabil ligaz enzimi ile birleştirilir. Ligasyona uğrayan oligonükleotit çiftler ve orijinal diziler bir sonraki siklusa kalıp olarak kullanılır. Tekrarlayan denatürasyon, bağlanma ve ligasyon sikluslarından sonra amplifikasyon ürünleri oluşur. Özgüllüğü yüksek bir testdir (88, 93).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): En kolay ve en yaygın kullanılan moleküler yöntemdir. Düşük miktardaki DNA ve RNA'yı sınırsız sayıda çoğaltmaya yarayan basit, hızlı ve duyarlı in vitro tanı yöntemidir. 1985 yılında Carry Mullis tarafından tanımlanmış ve günümüze kadar geliştirilerek kullanılmaya devam edilmiştir. Temel olarak yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan DNA polimeraz enzimi ve oligonükleotit DNA primeri kullanılarak, bir Thermo Cycler (Isı Dönüştürücüsü) yardımıyla kalıp DNA'nın in vitro ortamda çoğaltılması esasına dayanır (88, 94). PZR üç temel basamakta gerçekleşir:

Denatürasyon: Örnek DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır. Çoğunlukla 94°C-97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.

Annealing (Bağlanma): Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotit primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir. (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısı 68°C'ye kadar arttırılabilir)

Elongasyon (uzama): Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişir. Termal siklusun bu üç basamağının her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; kalıp DNA miktarı ve siklus sayısına bağlıdır. Yaklaşık 25-40 siklus uygulanır. Çoğaltılan DNA parçacıkları agaroz jelde etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole (UV) ışığı altında incelenir (88, 94).

Beta laktamaz enzimin hangi familyadan olduğunun saptanmasında hızlı ve kolay bir yöntemdir. Beta laktamaz genine spesifik oligonükleotit primerler gen bankalarından temin edilir. Ancak TEM, SHV, OXA beta laktamaz enzimlerinin GSBL ya da GSBL olup olmadığı konusunda ayrımı sağlayamaz (88).

DNA Dizi Analizi: DNA dizi analizi ya da sekanslama, DNA nükleotit baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Sıklıkla kullanılan Sanger dizi analiz yöntemi nükleik asit dizisinin komplementlerinin oluşumu sırasında her biri farklı floresan boyalar ile işaretli 2'-3' dideoksinükleotit trifosfatların (ddNTP) zincir sonlandırma işlemlerine dayanır. DNA polimerazı dNTP'lerin yanında deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri substrat olarak kullanır. Kalıp DNA, primer, dNTP ve DNA polimeraz karışımına ddNTP eklenir. Bağlanma ve uzama işlemleri uygulanır. Böylelikle farklı uzunlukta DNA parçaların oluşması sağlanır. Oluşan DNA parçaları poliakrilamit jelde elektroforeze tabi tutulur. Dizi analiz sonuçları radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılarak görünür hale getirilir. Günümüzde otomotize hale gelmiş olan bu yöntemde reaksiyon başlangıcında floresan veren madde ile işaretli primer yada nükleotitler kullanılarak baz dizilimi bilgisayar ortamında görünür hale getirilmektedir. Yöntem zor, pahalı ve uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvarlara ihtiyaç duymakla birlikte moleküler tanıda altın standarttır (95).

2.8. GSBL Üreten İzolatların Klonal Yayılımını İzlemede Kullanılan Moleküler Yöntemler

Hastane infeksiyonlarının kontrolü ve önlenmesinde infeksiyon etkeni izolatların tanımlanması, çevresel ya da kişisel kaynaklar ile klonal ilişkinin belirlenmesi ve salgın klonunun saptaması oldukça önemlidir. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesiyle epidemik izolatlar, endemik olanlardan ayrılmakta; toplum sağlığı

kontrolünde kullanmak üzere ulusal ve uluslar arası veri bankaları oluşturulabilmekte; herhangi bir yer ve zaman içindeki infeksiyonun özellikleri tanımlanarak daha etkin infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması sağlanmaktadır (96).

Fenotipik tiplendirme yöntemleri

Antibiyotik duyarlılık paneli, biyokimyasal ve antijenik profil, faj veya bakteriyosin tiplendirmesi ve multilokus enzim elektroforez yöntemi sıklıkla kullanılan fenotipik yöntemlerdir. Bu yöntemler yeteri kadar ayırım yeteneğine sahip olmaması ve kullanılabilirliğinin az olması nedeniyle kısıtlı etkinliğe sahiptir (100).

Genotiplendirme yöntemleri

Kromozomal DNA polimorfizimine dayalı yöntemlerdir. DNA spesifik restriksiyon endonükleaz enzimler ile kesime uğratılır. Ortaya çıkan DNA parçacıkları elektrikli bir ortamda hareket ettirilerek separasyona tabi tutulur. Ayrılan parçaların oluşturdukları bantlar etidyum bromid ile boyanarak ya da işaretli probalar kullanılarak görüntülenir. Genotipleme yöntemleri fenotipik metodlara göre daha güvenilir sonuçlar verir. En önemli avantajları ise standardize edilebilmeleri, farklı polimorfik yapıların güçlü bir şekilde ayrılması, ucuz, hızlı, basit ve duyarlı olmasıdır. Genotipleme yöntemleri nonamplifiye DNA'nın kullanıldığı direkt genotipleme ve ampifiye DNA'nın kullanıldığı genotipleme olmak üzere iki başlıkta ele alınmaktadır (97, 100).

1-Direkt DNA' nın Hedef Alındığı Yöntemler:

A-Plazmid DNA analizi:

Bakterilerin genotiplemesinde kullanılan ilk yöntemdir. Plazmidlerin mobil genetik element olması nedeniyle endemik ve epidemik hastane infeksiyonlarının birbirinden ayrılmasında fazla yardımcı değildir. Ayrıca klonal ilişkisiz izolatlarda aynı plazmidlerin bulunabileceği gibi klonal ilişkili izolatlarda farklı plazmidlerin bulunması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (97, 100).

B-Kromozomal DNA Restriksiyon Endonükleaz Analizi:

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Yöntemde mikroorganizmaların yoğun kültürlerinden kromozomal DNA elde edilir. Daha sonra çift sarmallı DNA'nın 4-6 bç'lik bölgelerine spesifik olarak bağlanıp kesme işlemi yapan restriksiyon enzimlerine tabi tutulur. Agaroz elektroforeziyle kesilen DNA parçaları ayrıştırılarak klonal ilişki araştırılır. Bu yöntemle suş için spesifik RFLP olarak tanımlanan band kalıpları oluşur. Bu kalıplara DNA parmakizi (DNA fingerprinting) denir. Tekrarlanabilirliği yüksek, kolay, hızlı ve ucuz bir yöntemdir (97, 100).

Ribozomal DNA RFLP analizi (Ribotipleme)

16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genleri hedef alan RFLP yöntemidir. Türler arasında ribozomal RNA'nın alt birimlerini kodlayan genler bakteri kromozomu boyunca dağılmaktadır ve bunların arasındaki DNA dizilimleri farklı uzunluklarda olabilmektedir. Endonükleaz enzimlerle kromozomal DNA'nın kesilmesi sonucunda oluşan parçalar ribozomal RNA probuyla hibridizasyona sokulduğunda, kökene özgü DNA bant profilleri elde edilmektedir. rRNA'yı kodlayan genler yüksek derecede korunmuş olduğundan tek bir proba (16S ve 23S rRNA *E. coli*-üniversal prob) tüm bakterilerin alt tiplmesi yapılabilmektedir. Ayrım gücü orta seviyede, tekrarlanabilirlik ve stabilitesi iyi olan bir metottur (97, 100).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Agaroz içine gömülü haldeki bakteri ve ökaryotik hücrelerden yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzim profilinin belirlenmesi esasına dayanır. Geleneksel agaroz jel elektroforezde 40-50 kilobaz (kb)'dan daha büyük DNA parçaları etkili olarak göç edememektedir. Büyük parçaların yürütülmesi, akım yönünün zikzak oluşumu ile mümkün olabilmektedir. PFGE'de belirli aralıklarla elektrik akımının yönü değiştirilerek; RE enzimle kesilmiş kromozomal DNA'dan oluşan 10-800 kb arasında uzunluğa sahip parçalar, etkin bir şekilde göç ettirilmekte ve bunun neticesinde büyük parçalar daha arkada, küçük parçalarda en önde olacak şekilde farklı büyüklükte DNA bant profili ortaya çıkmaktadır. Yöntemde; DNA izolasyonu ve restriksiyon enzimi ile kesim işlemleri agaroz kalıpları içinde yapılmakta, daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak agaroz içindeki uygun çukurlara yerleştirilerek belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Zaman alıcı bir yöntem olmakla birlikte üstün adaptasyon kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve ayrım gücü nedenleriyle majör nozokomiyal patojenlerin ve bazı toplum kaynaklı patojenlerin tiplendirilmesinde geçerli olan bir tipleme yöntemidir (97, 98).

Tenover ve arkadaşları suşların birbirleri ile olan ilişkisini tanımlamak için bir takım kriterler geliştirmişlerdir (99). Bu kriterlere göre:

Aynı izolat: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlardır. Genetik olarak birbiri ile aynı olarak kabul edilirler. Epidemiyolojik olarak ilişkilidirler.

Yakın ilişkili izolat: Salgın suşu ile aralarında 1-3 bant farklılığı olan izolatlar için kullanılır.

Muhtemel ilişkili izolat: Salgın suşu ile aralarında 4-6 bant farklılığı olan izolatlar için kullanılır. Epidemiyolojik olarak ilişkisi azdır. Bu şekilde gözlenen bant farklılıkları uzun bir sürede ya da çok büyük salgınlarda gözlenebilmektedir. Salgın suşu ile aynı genetik soydan olmakla birlikte genetik olarak yakın ilişkili değildir.

İlişkisiz izolatlar: Bu izolatlara ait DNA’da üç ya da daha fazla meydana gelen değişikliklere bağlı olarak, yedi ya da daha fazla bant farklılıkları gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar olarak yorumlanır (99).

Amplifikasyon Bazlı Yöntemler

Bu yöntemde hedef DNA öncelikle PZR ile amplifiye edilir. Daha sonra amplifiye edilen hedef DNA; RE ile işleme tabi tutulup agaroz jelde separasyona tabi tutulur (100). Bu yöntemin en fazla kullanılan formları şunlardır:

- “Repetitive extragenic palindromic element” (REP-PZR),
- “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD),
- “Arbitrarily primed” (AP)-PZR,
- “DNA amplification fingerpringing” (DAF),
- “Amplified fragment lenght polymorphism” (AFLP) (100).

AP-PZR, RAPD ve DAF Tipleme Yöntemleri: Bu tipleme yöntemlerinde hedefe bağlı kalınmadan, rastgele seçilmiş, kısa primerler kullanılarak DNA amplifiye edilir. Primerlerin rasgele olması nedeniyle amplifikasyon işleminde düşük bağlanma ısısı kullanılır. Ampilifiye DNA daha sonra agaroz jel elektroforezinde difüzyona tabi tutulur. Bant profillerinin farklılıklarına göre organizmalar tiplendirilir. Uygulama kolaylığı, kısa sürede sonuç verebilme özellikleri ve nispeten ucuz olmalarından dolayı yaygın kullanım alanı bulan bu yöntemlerin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır (100).

REP-PZR: Tekrarlayan ekstragenik elementlerin PZR ile amplifikasyonudur. Bu yöntemde mikroorganizma kromozomunun farklı bölgelerinde yer alan kısa, tekrarlayan, korunmuş bölgelerini hedef alan kısa primerler kullanılır. Bölgelerin birbirine çok yakın olmaması nedeniyle iki ekstra gen bölgesi arasındaki genler amplifiye edilir. Amplikonların sayısı ve uzunlukları agaroz jel elektroforez ile görüntülenir. Suşlar arasında tekrarlanan elementlerin sayısı ve lokalizasyon farkı moleküler tipleme için gerekli olan tipe özgü bant profilini oluşturmaktadır. REP-PZR;

AFLP gibi moleküler tiplendirme yoluyla suşlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada en sık kullanılan PZR bazlı tiplendirme yöntemlerindendir. REP-PZR tiplendirme kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede de kullanılabilir (100).

“Amplified fragment lenght polymorphism” (AFLP): Genomik DNA’nın genellikle iki restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonu esasına dayanır. Restriksiyon için çeşitli enzimler seçilebilir. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesi test performansını etkileyen iki ana faktördür. Yöntem yüksek ayırım gücüne sahiptir (97, 100).

Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST): Geleneksel multilokus enzim elektroforezinin genom bazlı versiyonudur. MLST toplum kaynaklı ya da hastane kaynaklı infeksiyon, uluslararası yaygın antibiyotiklere dirençli klonlar ile ilgili olarak oldukça önemli bilgiler vermektedir. 1998’de Maiden ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yüksek korunmuşluk özelliği olan, yaklaşık 500 bp’lik, “internal yedi” house keeping” genlerinin polimorfizmine bağlı sekans tiplendirme yöntemidir. Her bir lokustaki farklı sekanslar farklı alel numaraları ile tanımlanır ve her bir suş yedi lokustaki alele göre yedi sayının dizilimine göre tanımlanır. Diziler, MLST web sitesi (www.mlst.net) aracılığı ile her lokusteki bilinen aleller ile karşılaştırılır. Alel profillerine göre filogenetik analiz gerçekleştirilir. MLST geleneksel tiplendirme metodları ile uyum içinde kullanılmaktadır. Farklı laboratuvarlar ve coğrafik bölgelerden elde edilen isolatların karşılaştırmalarında bir referans yöntem olarak kullanılmaktadır. Global epidemiyolojide ideal bir yöntem olduğu gibi, salgınlar ve kısa süreli epidemilerin değerlendirilmesinde de faydalı bilgiler sağlamaktadır. Dezavantajı yoğun laboratuvar çalışması gerektirmesi ve ancak referans veya araştırma laboratuvarlarında uygulanabilmesidir (97). Örneğin toplum ve hastane kaynaklı MRSA klonlarının uluslararası görünümünü göstermek için kullanılmaktadır. GSBL üreten dirençli klonlarda MLST yöntemini kullanarak CTX-M-15 GSBL klonu ile uluslararası yayılım gösteren O₂₅H₄-ST131 tanımlanmıştır. Bu suş Kanada, Fransa, Lübnan, Portekiz, Güney Kore, İspanya, İsveç, İngiltere’de gösterilmiştir (101).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından desteklendi.

Çalışmada Haziran 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Hastanesi'nin farklı kliniklerinde yatan hastaların Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli materyallerinden (idrar, kan, yara vb.) izole edilen GSBL olduğu çift disk sinerji testi (ÇDST) ile gösterilen ve CDC kriterlerine göre hastane infeksiyonu olarak tanımlanan 76 *E. coli* suşu kullanıldı (15). Bu dönemler arasında izole edilen kolonizasyon veya kontaminasyon olarak değerlendirilen *E. coli* suşları çalışmadan çıkarıldı. Bir hastanın aynı dönemdeki tekrarlayan örnekleri çalışmaya dahil edilmedi.

3.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması

Kültürü yapılmak üzere laboratuvara gönderilen çeşitli klinik örnekler %5 koyun kanlı ve “Eosin Methylene Blue” (EMB) agar besiyerlerine ekildi. Ekimler aerob koşullarda 37°C’de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. EMB’de üreyen mikroorganizmalar laktozu kullanma özelliklerine göre değerlendirildi. Laktoz pozitif koloniler için ileri tanımlama işlemlerine geçildi. Glukozdan asit ve gaz oluşturma, sukroz ve laktoza etki ve H₂S oluşturma özelliklerini incelemek için üç şekerli demirli besiyerine (TSI), hareket özellikleri, indol üretimi, sitrat tüketimi ve üreye etkilerini araştırmak için ilgili besiyerlerine ekimler yapıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra *E. coli* olduğu gösterilen suşlar çalışmaya alındı (9, 11).

Besiyerlerinin Hazırlanışı

Trypton Soy Agar (Plasmatec UK):

Trypton	15 g/l
Soy pepton	5 g/l
Sodyum klorid	5 g/l
Agar	12 g/l

37 g Trypton Soy Agar 1000 ml distile suda ısıtılarak eritildi ve 121°C’de 15 dakika steril edildi. Besiyerinin içine soğumaya yakın 60 ml koyun kanı ilave edildi. Daha sonra 15-18 ml olarak 9 cm’lik petri plaklara dağıtıldı.

Eosin Metilen Blue Besiyeri (Plasmatec UK):

Pepton	10 g/l
Laktoz	10 g/l
Di potasyum fosfat	0.7 g/l
Eosin Y	0.4 g/l
Methylene blue	0.065 g/l
Agar	15 g/l

37.5 g besiyeri 1000 ml distile suda ısıtılarak eritildi, 121°C’de 15 dakika steril edildi ve 9 cm’lik petri plaklara 15-18 ml olarak dağıtıldı.

Mueller-Hinton Agar (HiMEDIA/India):

Beef heart infusion	2 g/l
Casein acid hydrolysate	17.5 g/l
Nişasta	1.5 g/l
Agar	17 g/l

38 g besiyeri 1000 ml distile suda sıcak su banyosunda ısıtılarak eritildi ve pH 7.3±0.2’a ayarlandı. 121 °C’de 15 dakika steril edildi ve 9 cm’lik petri plaklara 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı.

Simmons Citrate Agar (HiMEDIA/India):

Sodyum citrate	2 g/l
Sodyum klorid	5 g/l
Bromothymol blue	0.08 g/l
MgSO ₄	0.2 g/l
Amonyum dihidrojen fosfat	1 g/l
Dipotasyum fosfat	1 g/l
Agar	15 g/l

24.28 g besiyeri 1000 ml distile suda eritildi ve pH 6.8±0.2'a ayarlandı. 121 °C'de 15 dakika steril edildi ve tüplere dağıtılıp yatık durumda tutularak besiyeri katılaştırıldı.

Urea Agar Base (Christensen, HiMEDIA/India):

Peptic digest of animal tissue	1 g/l
Dextrose	1 g/l
Sodyum klorid	5 g/l
Monopotasyum fosfat	0.8 g/l
Phenol red	0.012 g/l
Agar	15 g/l

24 g besiyeri 950 ml distile suda eritildi. 115 °C'de 15 dakika steril edildi. 50°C kadar soğutulduğunda aseptik şartlarda süspanse edilen %40'luk üre solüsyonundan 50 ml eklendi ve tüplere dağıtılıp yatık durumda tutularak besiyeri katılaştırıldı.

SIM Medium (HiMEDIA/India):

Peptic digest of animal tissue	1 g/l
Beef Extract	3 g/l
Peptonized iron	0.2 g/l
Sodium Thiosulphate	0.025 g/l
Agar	3 g/l

36.23 g besiyeri 1000 ml distile suda eritildi. 121°C'de 15 dakika steril edildi ve tüplere dağıtıldı.

Triple Sugar Iron Agar (TSI, HiMEDIA/India):

Peptic digest of animal tissue	10 g/l
Casein enzymic hydrolysate	1 g/l
Yeast extract	3 g/l
Beef extract	3 g/l
Lactose	10 g/l
Sucrose	10 g/l
Dextroz	1 g/l
Sodyum klorid	5 g/l
Ferrous sulphate	0.2 g/l
Sodium thiosulphate	0.3 g/l
Phenol red	0.024 g/l
Agar	12 g/l

64.52 g besiyeri 1000 ml distile suda eritildi. 121°C’de 15 dakika steril edildi ve tüplere dağıtılıp yatık durumda tutularak besiyeri katılaştırıldı.

3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılıkları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre Kirby Bauer disk difüzyon (DD) yöntemi ile ticari antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Turkey) kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla; *E. coli* olarak tanımlanan suşların taze bakteri kültürlerinden steril fizyolojik tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonuna steril pamuklu eküvyon batırıldı ve eküvyon tüpün kenarına bastırılarak fazla inokulum uzaklaştırıldı. Bakteri emdirilmiş eküvyon, 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine plağı tamamen kaplayacak şekilde sürüldü. Plaktaki nemin kaybolması için 5-6 dakika bekletildikten sonra antibiyotik diskleri Kirby Bauer disk difüzyon yöntemine uygun şekilde steril pens ile besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Tüm plaklar 35°C’de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaktaki inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçüldü. Sonuçlar CLSI’nın önerdiği yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi (84).

Suşların antibiyotik duyarlılığını belirlemek için; amoksisilin/klavulanik asit (AMC 20/10 µg), seftriakson (CRO 30 µg), seftazidim (CAZ 30 µg), sefotaksim (CTX 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg), sefoksitin (FOX 30 µg), sefepim (FEP 30 µg), imipenem (İPM 10 µg), meropenem (MEM 10 µg), ertapenem (ERT 10 µg), sefoperazon/sulbaktam (CES 75/30 µg), piperasilin/tazobaktam (TZP 100/10 µg), amikasin (AN 30 µg), siprofloksasin (CIP 5 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT 23,75/1,25 µg) diskleri kullanıldı. Kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

3.3. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Araştırılması

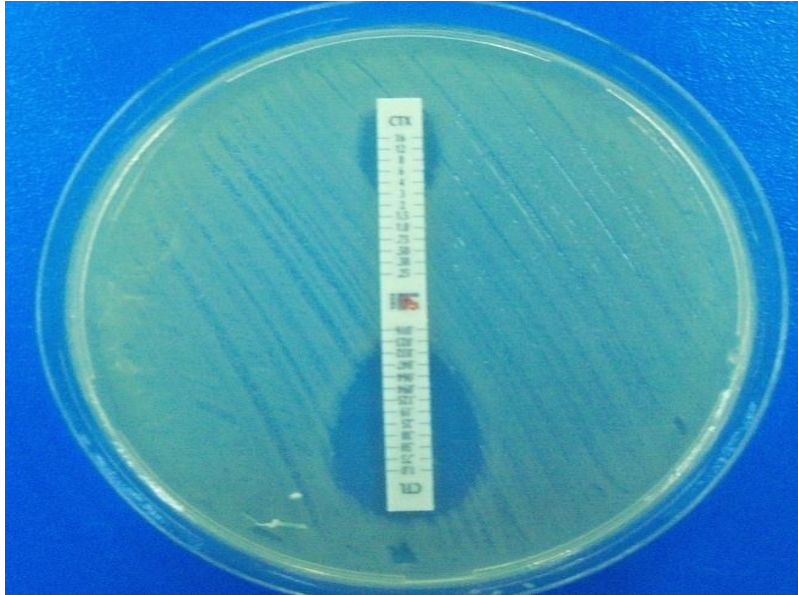
Bakterilerde GSBL varlığı ÇDST ile araştırıldı. Şüpheli durumlarda sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit E test stripleri (BioMerieux) ile doğrulama yapıldı.

Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST): Antibiyotik duyarlılığının çalışıldığı plakta diskler ÇDST’ne göre yerleştirildi. Plağın ortasına AMC diski çevreye ise merkezden merkeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam, sefepim, diskleri yerleştirildi. 35°C’de 18–20 saatlik inkübasyondan sonra çevredeki disklerden herhangi birinin inhibisyon zonunun AMC diskine doğru belirgin şekilde genişlemesi olumlu sonuç olarak değerlendirildi (Resim 1).



Resim 1. ÇDST ve DD yöntemine göre GSBL saptanması

E test GSBL testi: GSBL'in şüpheli olduğu durumlarda sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit E test stripleri (CTX/CTL, AB- BIODISK) ile doğrulama yapıldı. Stripler standart disk difüzyon testinde olduğu şekilde MHA besiyerine yerleştirildi. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra sefotaksim Minimal İnhibitör konsantrasyonu (MİK)'nın, sefotaksim-klavulanik asit MİK'una oranı ≥ 8 (3 dilüsyon ve daha yukarısı) ise GSBL oluşturduğu kabul edildi (83, Resim2).



Resim 2. CTX/CTL E testi.

3.4. Suşların Saklanması

GSBL olduğu gösterilen suşlar Skim Milk besiyerine (Hi MEDIA, India) pasaj alındı ve genotipik direnç paternleri çalışılincaya kadar -70 °C'de muhafaza edildi.

3.5. GSBL Enzimlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması: GSBL gen tipleri PZR yöntemi ile saptandı. Yöntemin başlıca basamakları;

3.5.1. DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon)

Suşlar MHA besiyerine genotip tayini için pasajlandı. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 1ml steril distile su içerisinde 4 Mcfarland bulanıklığında süspansiyon edildi. Her bir örnek en az 5 dakika vortekslenerek homojen hale getirildi. Daha sonra kuru ısı bloğunda (Wealtec Corp. USA) 90 °C’de 30 dakika kaynatıldı. Tekrar vortekslendi ve sonrasında 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Genomik DNA PZR işlemine kadar -20°C’de saklandı.

Uyumsuz sonuçlar için silika membran yöntemi (QiagenGmbH, Germany) ile ticari firmanın önerileri doğrultusunda ekstraksiyon tekrarlandı. Yöntemin başlıca basamakları;

-1.5 ml’lik ependorf tüpüne 25µl proteinaz K (20 µg/ml) ve 4 McFarland bulanıklığında hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl eklendi.

-Bu karışımın üzerine “AL tamponu” eklendi ve 10-20 saniyeden az olmamak üzere iyice vortekslenerek, 56 °C’de 10 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra kısa bir santrifüj yapıldı.

-Sonra 200 µl %96-100’lük etanol eklenerek vortekslendi ve ardından kısa süreli santrifüj yapıldı.

-Örneğin tamamı silika membran kolonuna (QiagenGmbH, Germany) aktararak 6000Xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

-Silika membran kolonu çıkarılarak atık tüpleri yenisi ile değiştirildi. Silika membran kolonun üzerine 500 µl “Buffer AW1” yıkama tamponu eklenerek 1 dakika 6000Xg’de santrifüj edildi.

-Atık tüpü yenisi ile değiştirilerek kolon üzerine 500 µl “Buffer AW2” eklenerek 20000Xg’de üç dakika santrifüj edildi. Silika membran kolonu yeni bir tüpe takılarak boş bir şekilde 20000Xg’de bir dakika santrifüj edilerek kalan sıvısında kolondan atık tüpe geçmesi sağlandı.

-Silika membran kolonu bu kez 1.5 ml’lik ependorf tüpe yerleştirildi. Üzerine 50 µl “AE tamponu” konularak bir dakika bekletildikten sonra 6000Xg’de bir dakika santrifüj edildi.

-Silika membran kolonu atılarak, tüpte biriken sıvı, DNA kaynağı olarak kullanıldı.

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışılan kökenlerde TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, OXA-2 grup, OXA-10 grup genlerinin varlığını araştırmak amacıyla PZR yapıldı. PZR için kullanılan solüsyonlar ve amplifikasyon şartları aşağıda belirtilmiştir:

2X amplifikasyon karışımının hazırlanışı:

10X buffer (Thermo SCIENTIFIC, UK)	200 µl
25 mM MgCl ₂ (Thermo SCIENTIFIC, UK)	120 µl
1.5mM dNTP (Promega, USA),	25 µl
<u>DNAaz RNAaz free Saf su (Sigma W-4502)</u>	<u>655 µl</u>
Toplam Hacim	1000 µl

PZR için amplifikasyon tüpünün hazırlanması

2X reaksiyon karışımı	25 µl
Primer-F	1 µl
Primer-R	1 µl
Taq DNA polimeraz (Simpler Red Taq DNA Polimeraz)	0.3 µl
DNAaz RNAaz free Saf su	17.7 µl
<u>DNA</u>	<u>5 µ</u>
Toplam hacim	50 µl

Amplifikasyon Koşulları: Amplifikasyon için GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/ USA) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon tüpleri cihaza yerleştirilerek 95°C’de 10 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 95°C’de bir dakika denatürasyon, her bir primer için bağlanma ısıları tablo 7’de tavsiye edilen derecede 1dakika ve 72°C’de 1.5 dakika uzama ile toplam 35 siklus ve final uzama olarak 72°C’de 3 dakika olacak şekilde uygulandı.

Tablo 5. PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler (102)

Hedeflenen gen bölgesi	Hedef Primer Adı	Primer dizilimi (5'-3')	Bağlanma Isısı (°C)
TEM 931 bç	TEM-F TEM-R	TCCGCTCATGAGACAATAACC TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	60
SHV 868 bç	SHV-F SHV-R	TGGTTATGCGTTATATTCGCC GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	60
CTX-M 909 bç	CTX-F CTX-R	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC CCGTTTCCGCTATTACAAAC	56
VEB 914 bç	VEB-F1 VEB-R1	GATAGGAGTACAGACATATG TTTATTCAAATAGTAATTCCACG	48
OXA-2 grup 478 bç	OXA-2-F OXA-2-R	AAGAAACGCTACTCGCCTGC CCACTCAACCCATCCTACCC	61
OXA-10 grup 720 bç	OXA-10-F OXA-10-R	GTCTTTCGAGTACGGCATTA ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	61
<i>bla</i> PER 927 bç	PER-F PER-R	ATGAATGTCATCACAAAATG TCAATCCGGACTCACT	48
<i>bla</i> GES 864 bç	GES-F GES-R	ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTGTCCGTGCTCAGG	58

3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonun Agaroz Jelde Elektroforezi

Agaroz jel elektroforez için aşağıdaki karışımlar hazırlandı:

10X TBE tamponu

Tris-Hydrochlorid (AppliChem, Darmstadt)	121,1 g
EDTA di-sodiumsalt dihydrate (AppliChem, Darmstadt)	3,8 g
Boric Asit (AppliChem, Darmstadt)	55.55 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı, pH: 8. 0'a ayarlandı.

1X TBE tamponu: Stok solüsyonu 10x TBE'den distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak elde edildi.

"Gel loading dye": Bromphenol 40 mg, gliserol 5 ml, 0.5 M EDTA 1.5 ml ve 4.5 ml distile su ile karıştırılarak elde edildi.

%2 Agaroze Jel: Agaroze (Sigma, USA)'dan 3 gr, 1x TBE tamponundan 150 ml alınıp karıştırılarak mikrodalga fırında (Arçelik) eritildi. Üzerine 5mg/ml'lık etidyum bromürden 0.5 ng/ml olacak şekilde bırakılarak 10 dakika soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankının jel dökme kalıbı yıkanıp kurulandıktan sonra jelin dışarıya akmasını önlemek için kalıbın her iki ucuna birbirine paralel olacak şekilde otoklav bantları ile kapatıldı. Kalıbın bir ucuna yakın olacak şekilde kuyucukları oluşturmak üzere 15 dişli bir tarak yerleştirildi Jel kalıbının içerisine hazırlanan jel hava kabarcığı oluşturmaktan döküldü. Kalıbın içindeki jelin katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletildi. Katılaştıran jel kalıbı taraklar çıkartıldıktan sonra kuyucuklar negatif kutupta olacak şekilde dikkatlice elektroforez tankının içine yerleştirildi. Tankın içi jelin üzeri tamamen kapanıncaya kadar 1X TBE ile dolduruldu. Çoğaltılmış DNA örneklerinin her birinden 9 µl alınıp parafin üzerinde 3 µl "Gel loading dye" solüsyonu ile karıştırıldı. Karışım daha sonra agaroz jel kuyucuklarına negatif kontrolde olacak şekilde yerleştirildi. Sonra tankın kapağı kapatıldı, pozitif ve negatif elektrotları yerleştirildi ve 100 voltta 2 saat yürütüldü. Oluşturulan bantlar UV ışığı altında DNA moleküler ağırlık standardı [DNA Molecular Weight Marker IX (0.072-1.35 kbp, Roche, Germany)] ile karşılaştırılarak yorumlandı ve fotoğrafları Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) ile çekildi.

3.6. *E. coli* 'nin Genotiplendirilmesinde Kullanılan PFGE Protokolü

Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin tespit edilmesi için Durmaz ve arkadaşlarının uyguladıkları, "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) yöntemi kullanıldı (98). Yöntemin basamakları;

İzolatların hazırlanması: Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 2500x g'de, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13.000x g 4°C'de 2 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroz gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

İzolatların Agaroz Gömülmesi: HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlandı. 0.2 g agaroz, 100 ml'lik balona konuldu. Üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2–3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agarozu kısa süreli mikrodalgada tutarak erime işlemi tamamlandı. Agaroz iyice çözüldükten sonra 45-50°C'lik su banyosunda kalıp hazırlama süresince tutuldu. Agaroz karışımından 500 µl'lik ependorf tüplere dağıtıldı ve işlem süresince 45-50°C'lik kuru ısı bloğunda bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlendi. HST içinde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500 µl alınarak 50°C ısı bloğunda bekletilen düşük erime ısılı agaroz eklendi. Pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. Agaroz karışımı hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (1mm by 5mm by 1.5mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi. Agarozun homojen katılaşması sağlandı.

Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması: Beş ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre parçalama tamponu-1(HPT-1) (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak HPT-1 solüsyonuna yerleştirildi. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. HPT-1 dökülerek, yerine 0.5 ml HPT-2 (0.5 M EDTA, 400 µg/ml proteinaz K) konuldu. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması: Dikkatlice HPT-2 aspire edildi. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen aspire edilip, su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Su tamamen aspire edildi. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) tamponuyla yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi: DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistüri yardımı ile 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri 100 µl 1x *Xba*I tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı;

10x <i>Xba</i> I tamponu	10 µl
<i>Xba</i> I enzimi (10 U/µl) (Fermentas, Life Sciences)	3 µl
<u>Steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)</u>	<u>87 µl</u>
Toplam hacim	100 µl

Bu karışım içerisinde, enzim tamponu ile yıkanmış agaroz kalıp konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Kalıplar elektroforez için hazır oldu.

Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi: 0.5X TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde %1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. 1 gr “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balona konup. üzerine 100 ml 0,5X TBE eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına aliminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında maximum derecede 60 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50°C’lik su banyosuna konuldu. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, sızdırmaması için etrafı bantlandı. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Kaset çerçeveleri çıkarılarak 1900-2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

Elektroforez: CHEF-DRII sisteminde (Bio-RAD Laboratories, NAZAeth, Belgium) başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat olacak şekilde elektroforez uygulandı.

Sonucun gözlenmesi ve analizi:

a. Elektroforez sonrasında jel, 5µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf suda 20 dakika bekletildi. UV ışık altında görüntülendi.

b. “Gel logic 2200 imaging system” (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi.

c. “Gel Compar II” yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan standartlar yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging” (UPGMA) kullanılarak PFGE profillerin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı %1-1.5 olarak alındı.

d. Tenover ve ark. tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi (99). Bu değerlendirmeye göre;

Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar genetik olarak farksız ve epidemiyolojik olarak ilişkilidir.

Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suş ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük olasılıkla salgınla ilişkili izolatlardır.

Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suş ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.

İlişkisiz izolatlar: Aralarında ≥ 7 bant farkı vardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Değişkenlere ilişkin veriler kategorik verilerden oluştuğu için tanımlayıcı ölçüt olarak sayı ve yüzde kullanıldı. Çalışmaya alınan tüm izolatların servislere göre dağılımı, izolatların elde edildiği örnekler, izolatların antibiyotik duyarlılıkları ve beta laktamaz gen yüzdesi hesaplandı. Antibiyotik duyarlılık oranlarının karşılaştırılmasında Fisher'in kesin ki-kare testi, Pearson ki-kare ve McNemar testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezinin değişik kliniklerinden Haziran 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerde hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve GSBL üreten 76 *E. coli* suşu bu çalışmada kullanılmıştır.

E. coli izolatlarının; %35'i yoğun bakım (%10 genel cerrahi, %7 organ nakli, %5 dahiliye, %5 reanimasyon, %3 beyin cerrahi, %3 kardiyoloji, %1 pediatri, %1 yenidoğan üniteleri olmak üzere), %16'sı dahiliye, %13'ü genel cerrahi, %12'si üroloji, %8'i pediatri, %3'ü göğüs hastalıkları, nöroloji ve beyin cerrahi, %1'i ortopedi servisinden elde edilmiştir. Kan izolatları en sık yoğun bakım ve dahiliye, yara izolatları en sık genel cerrahi, idrar izolatları ise en sık üroloji ve yoğun bakım bölümlerinden elde edilmiştir. Suşların klinik servislere göre dağılımı ve izole edildikleri örnek türleri Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. *E. coli* izolatlarının klinik servislere ve örneklere göre dağılımı.

Klinik Servisler / Örnek	İdrar	Kan	Yara	SVS*	Diğer	Toplam	
						n	%
Yoğun Bakım**	7	11	5	3	1	27	35
Dahiliye	3	9	0	0	0	12	16
Genel Cerrahi	1	1	6	2	0	10	13
Üroloji	8	0	0	1	0	9	12
Pediyatri	4	1	0	0	1	6	8
Organ Nakli	1	2	1	1	0	5	6
Göğüs Hastalıkları	0	1	1	0	0	2	3
Nöroloji	2	0	0	0	0	2	3
Beyin Cerrahi	0	0	2	0	0	2	3
Ortopedi ve Travmatoloji	0	0	1	0	0	1	1
Toplam	26 / 34	25 / 33	16 / 21	7 / 9	2 / 3	76	100

SVS*: Kan ve idrar dışındaki steril vücut sıvısı, Diğer: balgam, trakeal aspirat.

Yoğun Bakım**: Genel Cerrahi Yoğun Bakım, Organ Nakli Yoğun Bakım, Dahiliye Yoğun Bakım, Reanimasyon Yoğun Bakım, Beyin Cerrahi Yoğun Bakım, Kardiyoloji Yoğun Bakım, Pediyatri Yoğun Bakım, Yenidoğan Yoğun Bakımdan oluşmaktadır.

4.1. DD Yöntemine Göre Antibiyotik Duyarlılık Deneylerinin Sonuçları

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları Tablo 7’de gösterilmiştir. Bu tabloya göre izolatlar imipenem ve meropenem %100, ertapenem ise %83 duyarlı bulunmuştur. Meropenem ve imipenem ile ertapenem duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2 = 13.0$, $p < 0.05$).

Amikasin %100 ve gentamisin %50 duyarlılık saptanmış olup aralarındaki duyarlılık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2 = 38$, $p < 0.05$).

Amoksisilin/klavulanik asit %21, piperasilin/tazobaktam %61, sefaperazon/sulbaktam %63 duyarlılık bulunmuştur. Piperasilin/tazobaktam ve sefaperazon/sulbaktam ile amoksisilin/klavulanik asit duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).

Siprofloksasilin %41, tetrasiklin %22, trimetoprim/sülfometaksazol %29 duyarlı bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda seftazidime %18, sefepime %25 ve aztreonam %20 duyarlılık saptanmış olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

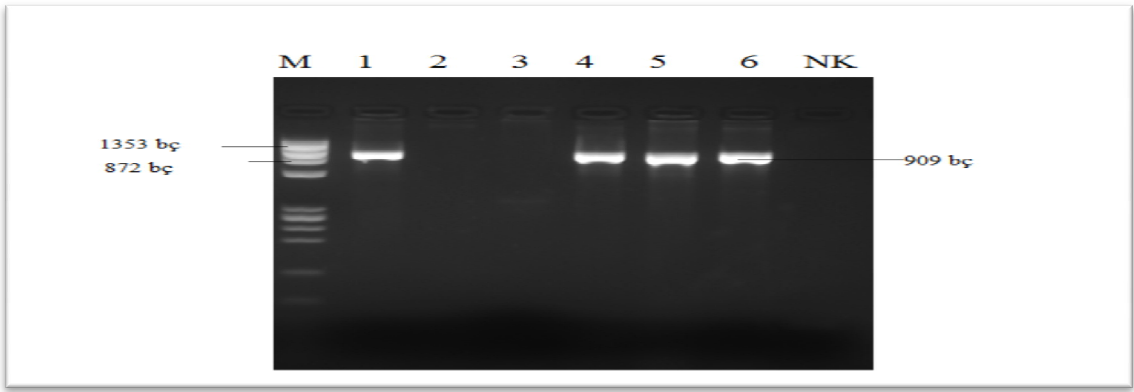
Ampisilin, karbenisilin, sefotaksim ve seftriaksona tüm suşlar dirençli bulunmuştur (Tablo 9, İstatistiksel değerlendirmede; orta derecede duyarlı olan suşlar dirençli gruba kaydırılmış ve tek grup olarak ele alınmıştır).

Tablo 7. *E. coli* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı.

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%
Seftazidim	14	18	62	82
Seftriakson	0	0	76	100
Sefotaksim	0	0	76	100
Sefepim	19	25	57	75
Aztreonam	15	20	61	80
Sefoksitin	73	96	3	4
Amikasin	76	100	0	0
İmipenem	76	100	0	0
Meropenem	76	100	0	0
Ertapenem	63	83	13	17
Amoksisilin-klavulanik asit	16	21	60	79
Piperasilin-tazobaktam	46	61	30	39
Sefoperazon-sulbaktam	48	63	28	37
Gentamisin	38	50	38	50
Siprofloksasin	31	41	45	59
Tetrasiklin	17	22	59	78
Trimetoprim-sulfametoksazol	22	29	54	71
Norfloksasilin	8	31	18	69
Nitrofurantoin	23	88	3	12
Karbenisilin	0	0	26	100
Ampisilin	0	0	76	100

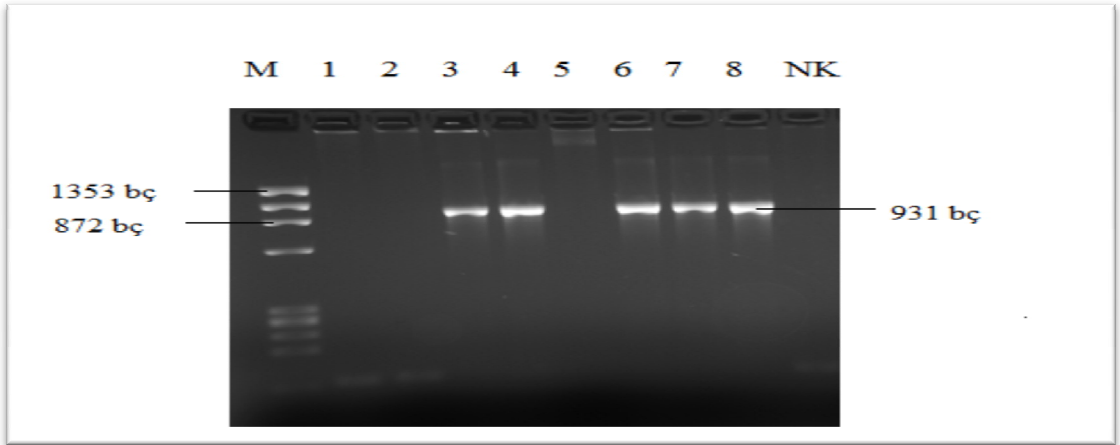
4.2. Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

CTX-M Beta-laktamaz: 909 bç'lik bölgede bant görünümü CTX-M beta laktamaz için pozitif kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 68'inde CTX-M beta laktamaz geni saptandı (Resim 3).



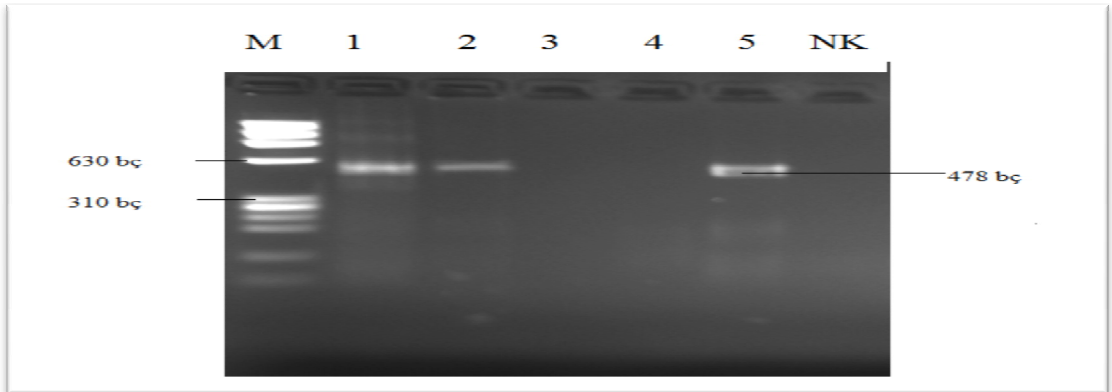
Resim 3. CTX-M PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

TEM Beta laktamaz: 931 bç'lik bölgede bant görünümü TEM beta laktamaz için pozitif olarak kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 45'inde TEM beta laktamaz geni saptandı (Resim 4).



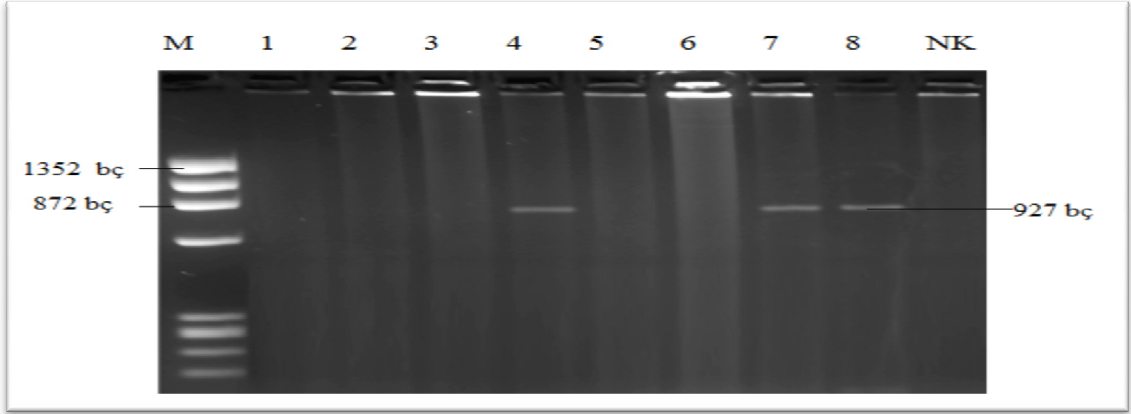
Resim 4. TEM PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

OXA-2 grup Beta-laktamaz: 478 bç'lik bölgede bant görünümü OXA-2 grup beta laktamaz için pozitif kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 12'sinde OXA-2 grup beta laktamaz geni saptandı (Resim 5).



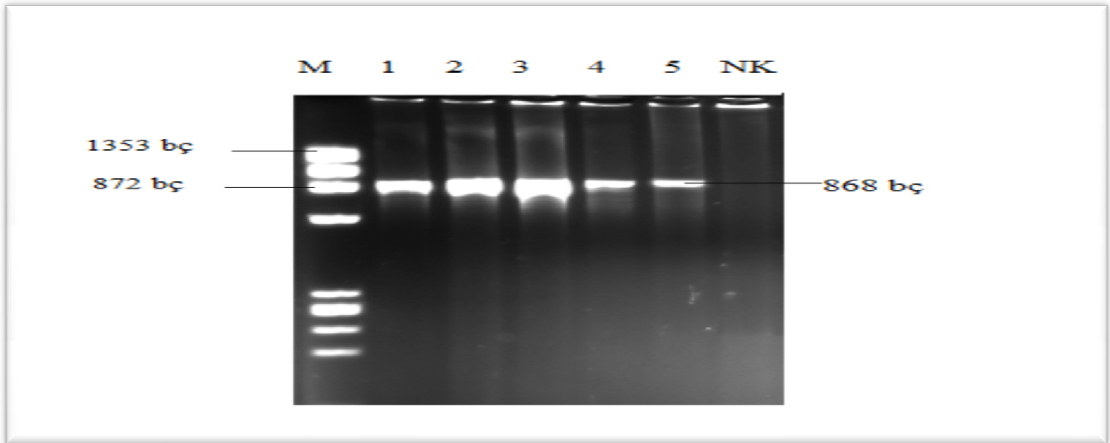
Resim 5. OXA-2 grup PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

PER Beta-laktamaz: 927 bç'lik bölgede bant görünümü PER beta laktamaz için pozitif kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 11'inde PER beta laktamaz geni saptandı (Resim 6).



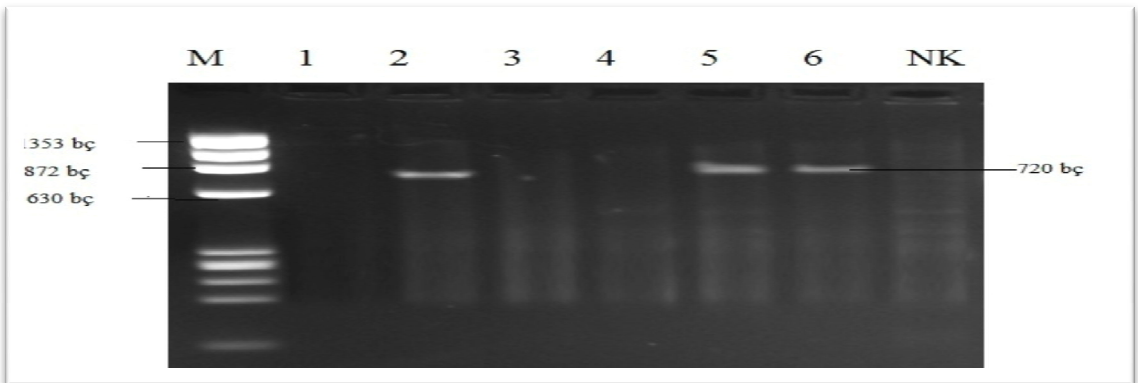
Resim 6. PER PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

SHV Beta-laktamaz: 868 bç'lik bölgede bant görünümü SHV beta laktamaz için pozitif kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 9'unda SHV beta laktamaz geni saptandı (Resim 7).



Resim 7. SHV PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

OXA-10 grup Beta laktamaz: 720 bç'lik bölgede bant görünümü OXA-10 grup için pozitif kabul edildi. 76 *E. coli* izolatlarının 3'de OXA-10 grup beta laktamaz geni saptandı (Resim 8).



Resim 8. OXA-10 grup PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi.

GES ve VEB Beta laktamaz: 864 bç'lik bölgede bant görünümü GES beta laktamaz için, 914 bç'lik bölgede bant görünümü VEB beta laktamaz için pozitif kabul edildi. Hiçbir izolatta GES ve VEB beta laktamaz geni saptanmadı.

4.3. Suşlarda Saptanan Beta Laktamaz Genleri

Suşların beta laktamaz gen prevalansı: CTX-M için %89.5, TEM için %59.2, PER için %14.5, OXA-2 grup için %15.8, SHV için %11.8, OXA-10 grup için %3.9 olarak bulunmuştur. Hiçbir izolatta GES ve VEB beta laktamaz geni saptanmamıştır (Tablo 8, 9). Bir izolatta ÇDST ve E testi ile GSBL üretimi fenotipik olarak saptanmasına rağmen araştırılan genlerden hiçbirisi bulunmamıştır (Tablo 8, 38 nolu suş).

Tablo 8. *E. coli* izolatlarının beta laktamaz gen birliktelikleri ve genotipleme

Sıra No	Suş No	TEM	SHV	CTX-M	OXA-2 grup	OXA-10 grup	PER	GES	VEB	Geno tip
1	1			+	+					57
2	2			+	+	+				55
3	3	+		+						41
4	4	+		+						58
5	5			+						18
6	6		+	+						37
7	7	+		+	+					39
8	8	+			+	+				63
9	9	+								59
10	10			+						60
11	11			+		+				42
12	12			+	+					14
13	13			+						46
14	14			+						29
15	15	+		+						2b
16	16			+						11
17	18			+						21
18	19	+		+						34b
19	20			+						22
20	21			+	+					27b
21	22	+		+						23
22	23	+		+						46b

Sıra No	Suş no	TEM	SHV	CTX-M	OXA-2 grup	OXA-10 grup	PER	GES	VEB	Geno tip
23	24			+						17
24	25			+						9
25	26			+						51
26	27	+		+						52
27	28	+		+						13
28	29			+						69
29	30	+		+						24
30	31	+		+			+			50
31	32	+					+			48
32	33			+						43
33	34	+	+	+						34
34	36	+	+	+						3
35	37			+						66
36	38									64
37	39	+		+						65
38	40	+		+	+					67
39	41	+								54
40	43	+		+						15
41	45	+		+						4
42	46			+						47
43	47	+		+						36
44	48	+		+						19
45	49			+						7
46	50			+						68
47	51	+		+						25
48	52	+		+						53
49	53	+			+					5
50	54	+		+						35
51	55	+		+						28
52	56	+		+			+			28
53	58	+		+						26
54	59			+			+			6
55	60	+		+			+			40
56	61	+		+						61
57	62			+						10
58	63			+						32
59	64	+		+			+			8

Sıra No	Suş no	TEM	SHV	CTX-M	OXA-2 grup	OXA-10 grup	PER	GES	VEB	Geno tip
60	65			+						30
61	66			+						27
62	67	+		+			+			62
63	68	+		+			+			31
64	69		+	+			+			10b
65	70	+	+	+						12
66	71	+		+	+					16
67	72	+		+						49
68	73	+		+						44
69	74	+		+						2
70	76	+		+						1
71	77	+		+						1a
72	78	+	+							45
73	79		+	+	+		+			33
74	80		+	+			+			38
75	81			+	+					56
76	82	+	+		+					20

Tablo 9. *E. coli* izolatlarının beta laktamaz gen oranları.

Sıra No	Beta laktamaz gen adı	Pozitiflik sayısı		Negatiflik sayısı	
		n	%	n	%
1	CTX-M	68	89.5	8	10.5
2	TEM	45	59.2	31	40.8
3	OXA-2 grup	12	15.8	64	84.2
4	PER	11	14.5	65	85.5
5	SHV	9	11.8	67	88.2
6	OXA-10 grup	3	3.9	73	96.1
7	VEB	0	0	7	100
8	GES	0	0	76	100

4.4. Suşlarda Saptanan Beta Laktamaz Genlerinin Birlikte Bulunma Sıklıkları

Suşlar beta laktamaz gen açısından incelendiğinde; yalnız CTX-M beta laktamaz geni bulunduran suş sayısı 20, yalnız TEM beta laktamaz geni bulunduran suş sayısı 2,

TEM ve CTX-M beta laktamazını birlikte bulunduran izolat sayısı 25, TEM/SHV/CTX-M birlikteliği gösteren izolat sayısı ise 3 olarak saptanmıştır. Yalnız SHV geni bulunduran izolat saptanmamıştır. Suşlara ait beta laktamaz genlerinin birlikte bulunma sıklıkları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. *E. coli* izolatlarının beta-laktamaz gen birliktelikleri.

Sıra No	PZR ile pozitif bulunan beta laktamaz genleri	Gen bulunduran izolat sayısı (n: 75)	Yüzde (%)
1	TEM/CTX-M	25	33.7
2	Yalnız CTX-M	20	27.0
3	TEM/ CTX-M/ PER	6	8.1
4	OXA-2grup/CTX-M	4	5.4
5	TEM/SHV/CTX-M	3	4.0
6	TEM/CTX-M/OXA-2grup	3	4.0
7	Yalnız TEM	2	2.7
8	SHV/ CTX-M/ PER	2	2.7
9	SHV/CTX-M	1	1.4
10	TEM/SHV	1	1.4
11	CTX-M/ OXA-2/ OXA-10 grup	1	1.4
12	TEM/ OXA-2/ OXA-10 grup	1	1.4
13	CTX-M/OXA-10 grup	1	1.4
14	TEM/PER	1	1.4
15	TEM/OXA-2grup	1	1.4
16	CTX-M/ PER	1	1.4
17	TEM/SHV/PER	1	1.4
18	SHV/ CTX-M/ OXA-2 grup/PER	1	1.4
19	Yalnız SHV	0	0

4.5. Yalnız CTX-M ve TEM/CTX-M Bulunduran *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Suşların GSBL enzimlerinin varlıklarına göre antibiyotik duyarlılıkları tablo 11'de gösterilmiştir. Bu tabloya göre suşların siprofloksasilin duyarlılığı; TEM/CTX-M birlikteliğinde %44 iken, yalnız CTX-M geni bulunduran izolatlarda %25'e düşmekle

birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Tüm beta-laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarının duyarlılığı; TEM/CTX-M birlikteliği olan izolatlarda, yalnız CTX-M bulunduran izolatlara göre daha düşük saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Seftazidim, sefepim ve aztreonam duyarlılıklarında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. TEM/CTX-M bulunduran izolatlarda sefotaksime, yalnız CTX-M bulunduran izolatlarda ise seftriakson ve sefotaksime duyarlılık saptanmamıştır.

Tablo 11. Yalnız TEM/CTX-M ve CTX-M bulunduran izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.

Antibiyotik	Yalnız TEM/CTX-M (n=25)		Yalnız CTX-M (n=20)	
	n	%	n	%
Ertapenem	19	76	16	80
Siprofloksasilin	11	44	5	25
Amoksisilin-klavulanik asit	3	12	3	15
Piperasilin-tazobaktam	13	52	14	70
Sefaperazon-sulbaktam	13	52	15	75
Seftazidim	4	16	3	15
Sefepim	5	20	6	30
Aztreonam	5	20	4	20
Seftriakson	1	4	0	0
Sefotaksim	0	0	0	0

4.6. Suşların PFGE Yöntemine Göre Tiplendirilmesi

PFGE yöntemiyle 76 *E. coli* suşunun 14'ünün (%19) bir küme içinde olduğu saptandı. Bu suşlar 7 küme içinde yer aldı. 69 farklı genotipik profil saptandı. Baskın klon ya da salgın klon saptanmadı (Resim 9, Şekil 2. PFGE *E. coli* dendrogram).

Küme İçinde Yer Alan Suşların Epidemiyolojik İlişkileri

Birinci küme (1): İki suş içermektedir. İlk suş 06.12.2010 tarihinde kardiyoloji yoğun bakımda yatan hastanın idrar örneğinde, ikinci suş aynı tarihte pediatri servisinde yatan hastanın balgam örneğinden izole edildi. Suşlar birbirleri ile yakın ilişkili olarak saptandı.

İkinci küme (2): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 01.12.2010 tarihinde dahili yoğun bakım servisinde yatan hastanın yara örneğinden izole edildi. İkinci suş ise dahiliye servisinde yatan hastanın kan örneğinden 11.07.2010 tarihinde izole edildi. Suşlar birbirleri ile muhtemel ilişkili olarak saptandı.

Üçüncü küme (10): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 01.09.2010 tarihinde üroloji servisinde yatan hastanın idrar örneğinde izole edildi. İkinci suş genel cerrahi yoğun bakımda yatan hastanın kan örneğinden 21.10.2010 tarihinde izole edildi. Suşlar birbirleri ile muhtemel ilişkili olarak saptandı.

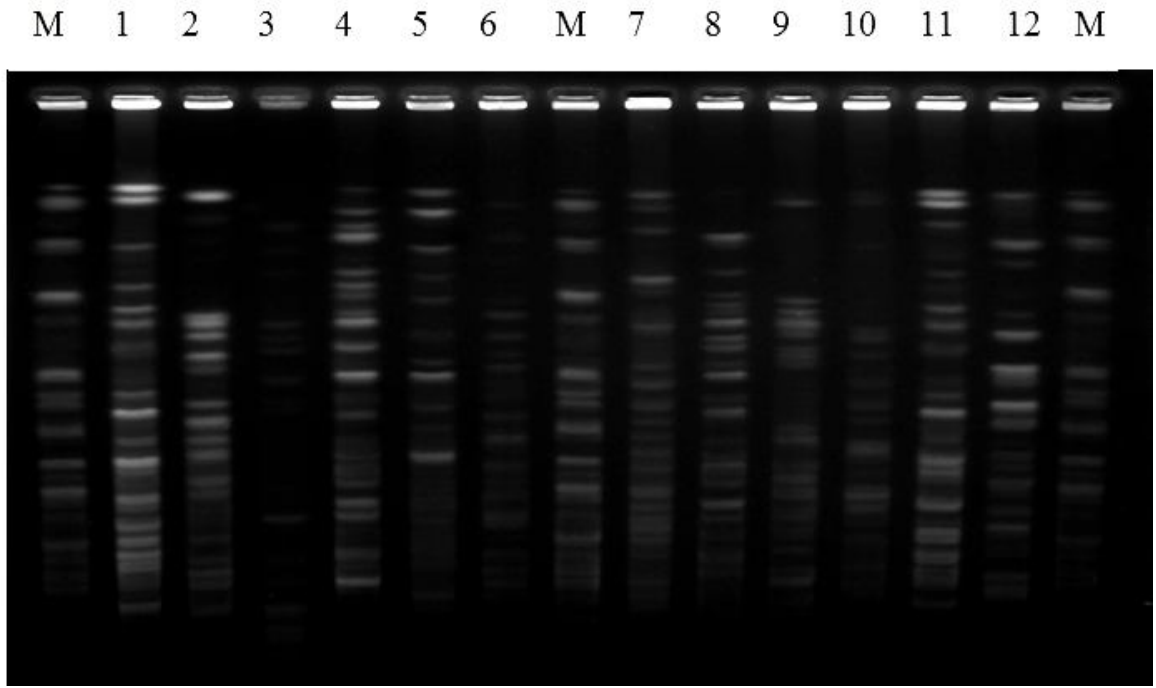
Dördüncü küme (27): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 15.09.2010 tarihinde üroloji servisinde yatan hastanın idrar örneğinden izole edildi. İkinci suş 10.06.2010 tarihinde dahiliye servisinde yatan hastanın idrar örneğinden izole edildi. Suşlar birbirleri ile muhtemel ilişkili olarak saptandı.

Beşinci küme (28): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 23.10.2010 tarihinde reanimasyon servisinde yatan hastanın idrar örneğinde izole edildi. İkinci suş 14.10.2010 tarihinde yenidoğan yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan örneğinden izole edildi. Suşlar birbirleri ile klonal ilişkili olarak saptandı.

Altıncı küme (34): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 19.08.2010 tarihinde beyin cerrahi servisinde yatan hastanın idrar kültürü örneğinden izole edildi. İkinci suş 05.07.2010 tarihinde dahili yoğun bakımda yatan hastanın idrar örneğinde izole edildi. Suşlar birbirleri ile muhtemel ilişkili olarak saptandı.

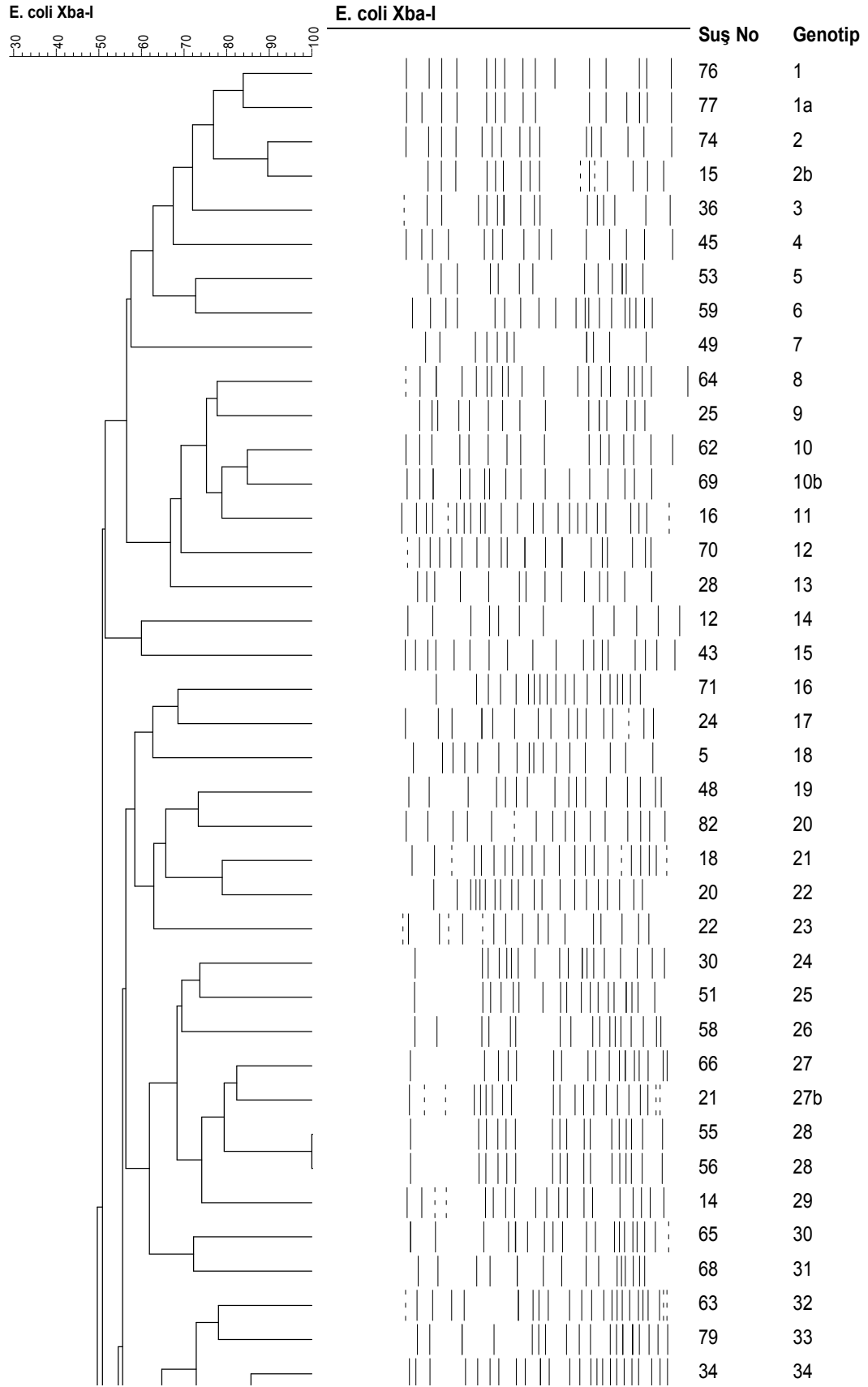
Yedinci küme (46): İki suştan oluşmaktadır. İlk suş 03.07.2010 tarihinde organ nakli yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan örneğinden, ikinci suş 02.08.2010 tarihinde dahili yoğun bakım servisinde yatan hastanın kan örneğinden izole edildi. Suşlar birbirleri ile muhtemel ilişkili olarak saptandı.

Beşinci küme dışındaki kümelerde yer alan hastaların yaş profili, enfeksiyon tipi, izole edildikleri örnek ve bölümler birbirinden farklı olarak saptandı.



Resim 9. GSBL üreten *E. coli* suşlarının XbaI enzimi ile kesimin ardından oluşan PFGE modellerine ait örnekler (M: *E. coli* ATCC 25922 suşu PFGE belirteci. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; suş no'ları. Suşların PFGE yöntemine göre genotipleri sırasıyla;57, 55, 41, 58, 18, 37, 39, 63, 59, 60, 42, 14).

Şekil 2. *E. coli* Dendrogramı.



		79	33
		34	34
		19	34b
		54	35
		47	36
		6	37
		80	38
		7	39
		60	40
		3	41
		11	42
		33	43
		73	44
		78	45
		13	46
		23	46b
		46	47
		32	48
		72	49
		31	50
		26	51
		27	52
		52	53
		41	54
		2	55
		81	56
		1	57
		4	58
		9	59
		10	60
		61	61
		67	62
		8	63
		38	64
		39	65
		37	66
		40	67
		50	68
		29	69

5.TARTIŞMA

Escherichia coli insanlarda nozokomiyal ve toplum kaynaklı infeksiyonların önemli bir sebebidir. Bu bakteriye bağlı infeksiyonlar sıklıkla endojen kaynaklı olup hastanın kendi barsak florasından köken alır. Üriner sistem infeksiyonları, enterik infeksiyonlar ve sistemik infeksiyonların önemli bir sebebidir. Sistemik infeksiyonlardan; bakteriyemi, nozokomiyal pnömoni, kolesistit, kolanjit, peritonit, selülit, osteomyelit ve infeksiyöz artrit gibi infeksiyonlara neden olur (11). Son yıllarda hastane infeksiyonlarında izole edilen Gram negatif bakteriler arasında GSBL üreten *E. coli*'nin sıklığının artması önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun nedeni özellikle toplumda sağlıklı CTX-M üreten *E. coli* taşıyıcılığın artmasıdır (103).

Çoğul ilaca dirençli GSBL üreten *E. coli* için tedavi seçenekleri sınırlıdır ve başlangıç ampirik tedavi sıklıkla başarısız olmaktadır. Bu nedenle bu tip mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların erkenden tanımlanması uygun tedavinin başlanması yönünden kritik öneme sahiptir. IDSA (Infectious Diseases Society of America) 2006 raporuna göre GSBL üreten *E. coli* acil yeni antibakteriyel ajanlara ihtiyaç duyulan dirençli patojenler arasına girmiştir (104).

GSBL'ler bazı bakterilerin kromozomal yapısında olmakla birlikte sıklıkla sonradan plazmidler aracılığı ile kazanılırlar. Toplumda plazmid ve integron aracılı yayılım özelliği gösteren bu enzimler tehlikeli boyutlara varacak şekilde nozokomiyal patojenlerin de direnç oranlarını artırmıştır (4, 50). Nozokomiyal infeksiyonlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde daha sık gözlenmektedir. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram-negatif basillerin antibiyotik duyarlılığıyla ilgili yapılan çok merkezli bir çalışmada antibiyotik direncinin en önemli nedeni olarak GSBL üretimi gösterilmektedir (105). Tayvan'da yapılan bir başka çalışmada ise nozokomiyal kaynaklı bakteriyemilerde *Acinetobacter* ve GSBL üreten *Klebsiella* spp. dışında, florokinolon ya da sefalosporine dirençli *E. coli* ve GSBL üreten *E. coli* tehlike oluşturan Gram negatif patojenler olarak saptanmıştır (106).

Nozokomiyal kaynaklı infeksiyon tipleri ve etkenleri izole edildikleri bölüm ve bölgelere göre değişebilmektedir. Hastanemizde 1996 yılında Durmaz ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada hastane infeksiyonu sıklıkla yoğun bakım, genel cerrahi ve ortopedi bölümlerinde ve cerrahi yara yeri ve üriner sistem infeksiyonu olarak saptanmıştır. Bu çalışmada en sık izole edilen etkenler *Enterobacteriaceae* üyeleri ve *S. aureus* olarak saptanmıştır (107). Hastanemizde yine 2003 yılında Ersoy ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada hastane infeksiyonu en sık yenidoğan ve yoğun bakım bölümlerinde dolaşım ve solunum sistem infeksiyonları şeklinde karşımıza çıktığı saptanmıştır. Yine bu çalışmada en sık izole edilen etkenler *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *E. coli* ve *Acinetobacter spp.* olarak tanımlanmıştır (108). Çelik ve ark.'da hastane infeksiyonlarını sıklıkla yoğun bakım bölümlerinde ve *E. coli* ve *Pseudomonas* türlerinin etken olduğu dolaşım ve solunum sistemi infeksiyonları olarak saptamışlardır (109). Leblecioğlu ve ark.'nın beş yıllık sürveyans şeklinde yoğun bakım ünitesinde yapmış oldukları bir çalışmada ise en sık *Pseudomonas spp.*, ikinci sıklıkta ise *E. coli*'yi etken olarak izole etmişlerdir (110). Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise hastanemizde yapılmış çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde GSBL üreten *E. coli* izolatları en sık yoğun bakım bölümlerinden, sonrasında ise dahiliye ve genel cerrahi servisinden izole edilmiştir. GSBL üreten *E. coli* izolatlarının en sık saptandığı örnekler ise sırayla idrar, kan ve yara olmuştur.

GSBL oranları ülkeler ve hastaneler arasında farklılık göstermekle birlikte son yıllarda oldukça artış göstermiştir (7). Korten ve ark.'ı 2000-2003 yılları arasında dokuz merkezden elde ettikleri izolatlar ile yapmış oldukları çalışmada GSBL oranını *E. coli* için %19.5 olarak saptamışlardır (111). Zarakolu ve ark. nozokomiyal infeksiyon etkeni Gram negatif patojenler üzerinde MYSTIC program çerçevesinde 2000-2004 yılları arasında yapmış oldukları çalışmada GSBL oranını; *E. coli* için %28 ve *K. pneumoniae* için %47 olarak saptamışlardır (112). Gür ve ark.'nın HİTİT-2 olarak 2007'de yaptıkları bir çalışmada ise *E. coli* için GSBL oranı %42 ve *K. pneumoniae* için ise %41.4 ile birbirine yakın bulunmuştur (113). Hastanemizde GSBL oranları ile ilgili 2002'de yapılmış bir çalışmada *E. coli* için GSBL oranı; idrar izolatları için %30.6 ve kan izolatları için ise %34.5 olarak yüksek bulunmuştur (114, 115). Bir diğer çalışma ise 2009 yılında yapılmış ve en sık idrar izolatlarında olmak üzere *E. coli* için GSBL oranı %27.5 olarak saptanmıştır (116). Ülkemizde gözlenen bütün bu farklı GSBL oranları ile birlikte Akyar ve ark.'nın yakın zamanda yapmış oldukları bir çalışmada; *E. coli* suşlarının GSBL oluşturma oranlarının her yıl artış gösterdiğini 2004'de %3.8'den

2008'de %17.2'ye çıktığını saptamışlardır. *Klebsiella* suşlarında ise 2004 ve 2005'de yakın olan oranlar 2006'da anlamlı derecede artmış (%7.7'den %15.7'ye), 2007 ve 2008'de yine yüksek düzeyde (%16.3) saptanmıştır (117). 2006'da İspanya'da yapılan bir araştırmada tüm bu artışları destekler şekilde bir sonuç elde edilmiştir. Bu sonuca göre GSBL üreten *E. coli* ile infeksiyon ya da kolonizasyon oranı; 1996'da 1.65 epizod /100.000 hasta-gün iken 2002 yılında 12.6 epizod /100.000 hasta-gün olarak bulunmuştur (118).

Dünyada çok farklı GSBL oranları mevcuttur. Çok merkezli bir araştırma programı olan MYSTIC çalışmasının 2000 yılı sonuçlarına göre Doğu Avrupa hastanelerinde GSBL üreten bakterilerde belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada *E. coli*'deki GSBL oranları Brezilya'da %19.6, Amerika'da %5 oranında, *Klebsiella* spp. suşlarındaki GSBL oranları ise Brezilya'da %62, Amerika'da %5.9 oranında saptanmıştır (119). 2007'de Turner'in yapmış olduğu Mystic Avrupa Meropenem çalışmasında 28 merkezden 5208 izolat taranmış; tüm *Enterobacteriaceae* arasından en sık *E. coli*'nin saptandığı bu çalışmada GSBL oranı *E. coli* için %4.9, *K. pneumoniae*'de %7.2 olarak ülkemize göre oldukça düşük saptanmıştır (120). 2003-2004 ARMED-EARSS raporuna göre GSBL üreten *E. coli* sıklığında birinci sırada %70 ile Mısır, sonra da %27.8 ile Türkiye gelmektedir (121). Canton ve ark.'ı ise ülkeler arasında farklılık olmakla birlikte; Avrupa'daki GSBL oranının Amerika'dan yüksek, Asya ve Güney Amerika'dan ise düşük olarak saptamışlardır. Epidemik plazmidler ile yaygınlaşan spesifik klonlar; GSBL üreten izolat artışından sorumlu tutulmuş ve bu izolatlarda TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 ve CTX-M-32 enzimleri sıklıkla saptanmıştır. Aynı zamanda tüm bu izolatlarda CTX-M tipi beta laktamazların belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır (7).

GSBL üreten mikroorganizmalar ile infeksiyon ya da kolonizasyon için çeşitli risk faktörleri tanımlayan çalışmalar vardır. GSBL üreten *E. coli* bakteriyemili kanser hastaları ile yapılan bir araştırmada kadın cinsiyet, hematolojik malignensi ve öncesinde antibiyotik tedavisi almak GSBL kazanımı için risk faktörleri olarak saptanmıştır (122). Yine İsviçre'de üçüncü basamak hizmeti veren bir hastanede yapılan vaka kontrol çalışmasında; hastaneye kabul edilmeden önce antibiyotik kullanımı, yoğun bakım ünitesinde mekanik ventilasyon kullanımı ve GSBL'nin yüksek sıklıkta gözleendiği ülkelere seyahat; GSBL üreten *E. coli* infeksiyonları için risk faktörü oluşturduğu bulunmuştur (123). Goyal ve ark.'nın Hindistan'da yapmış oldukları çalışmada GSBL üretimini *E. coli* için %63.6 ve *K. pneumoniae* için ise %66.7 olarak saptamışlardır.

Yine bu çalışmada önceden antibiyotik kullanımı, intravenöz ya da üriner kateter varlığı, renal yetmezlik ve yoğun bakım ünitesinde yatış ile GSBL üreten mikroorganizma ile infeksiyon arasında ilişkili bulunmuştur (124).

GSBL üreten *E. coli* izolatları toplumda hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Tartışmalı olmakla birlikte; fekal taşıyıcılığın kişiden kişiye yayılımı, yiyecekler ile GSBL üreten *E. coli* izolatların kazanımı, çevresel izolatlarda yaygınlığı, vahşi ve evcil hayvanlarda taşıyıcılık, uzun süreli bakım merkezlerinde kalış öyküsü toplumsal yaygınlığın nedenleri arasındadır (103). Tayland’lı sağlıklı kişilerde sefotaksimli Mac Conkey agar ile yapılan dışkı taramaları sonucu GSBL üreten *E. coli* %61.7 olarak saptanmış; bu izolatların %93.7’de CTX-M üreten GSBL geni baskın olarak saptanmıştır (125). Yine Çin’de 270 yaşlı kişide yapılan rektal tarama sonucunda GSBL oranı %7 olarak saptanmış ve tüm GSBL üreten izolatların klonal olarak ilişkisiz olduğu bulunmuştur (126). İspanya’da ise tamamen sağlıklı 105 insanın %6.7’sinde GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı saptanmıştır. Bu izolatların büyük bir kısmında CTX-M beta laktamazı saptanmıştır (127). Bir diğer çalışmada ise GSBL üreten *E. coli* ile üriner sistem infeksiyonu olan hastaların fekal örneklerinde %67 oranında CTX-M beta laktamazı saptanmış, hastaların %27.4’ünün aynı evde yaşayan kişiler arasında etkenin yayılımı sonucu infeksiyona yakalandıkları saptanmıştır (128).

Çocuklardan izole edilen mikroorganizmalarda da CTX-M gen pozitifliği saptanmıştır. Portekiz’de sağlıklı çocukların fekal örneklerinden yapılan taramalarda TEM-52, SHV-12 ve CTX-M-1 tipinde GSBL genlerine sahip GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığının %2.7 oranında olduğu saptanmıştır (129). Aynı şekilde Kore’de bakteriyemili çocuklardan elde edilen mikroorganizmalarda yapılan GSBL gen taramalarında TEM-52 ve SHV-2a baskın gen, CTX-M ise daha az olacak şekilde saptanmıştır (130). Yine Latin Amerika’da yapılan bir çalışmaya göre tamamen sağlıklı çocuklardaki CTX-M fekal taşıyıcılık oranını 2002’de %0.1 iken 2005’de %1.7 oranına ulaştığı saptanmıştır (131). Çalışmamızda pediatri servisinde 6 diğer servislerde 4 olmak üzere toplam 10 pediatrik hastada baskın gen CTX-M olacak şekilde GSBL üreten *E. coli* ile infeksiyon saptanmıştır.

Uzun süreli bakım merkezleri çoğul ilaca dirençli *E. coli* izolatları için bir rezervuar görevi üstlendiği için bu merkezlerde infeksiyon kontrol önlemleri oldukça önemlidir. İrlanda’da 194 bakım evinde GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılık oranı %40.5 olarak saptanmıştır. Bu rakam aynı coğrafik bölgede toplum kökenli diyaresi olan hastalar ile kıyaslandığında yaklaşık kırk kat fazla bulunmuştur. Florokinolon kullanımı

ve önceden üriner sistem infeksiyonu geçirmek GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı ile ilişkili risk faktörleri olarak saptanmıştır (103, 132). İtalya Bolzano’da uzun süreli bakım merkezlerinde kalan 111 kişinin %64’de GSBL üreten *E. coli* ile kolonize olduğu saptanmıştır. Bu izolatların %81’i grup1 CTX-M, %4’ü CTX-M-14 ve %13’ü SHV-5 olarak saptanmıştır. Aynı zamanda üç ay öncesinde antibiyotik kullanımı ve invaziv alet girişimi GSBL üreten *E. coli* ile kolonizasyon için risk faktörleri arasında bulunmuştur (133).

1990’lı yılların sonlarına doğru, *Enterobacteriaceae*’de özellikle *K. pneumoniae*’de üretilen plazmid ve transpozonlarla aktarılabilen SHV ve TEM tipi GSBL klasik olarak ciddi nozokomiyal infeksiyonlardan sorumlu tutulmuştur. Bu tipteki GSBL enzimleri Bush sınıflamasına göre grup 2b enzimlerden olup TEM-1, SHV-1 ve TEM-2 enzimlerinden bir ile dört aminoasit değişimi sonucu oluşmuştur. Başlangıçta sınırlı sayıda olan GSBL enzimlerinin sayısı; geniş spektrumlu sefalosporinlerin klinik kullanıma girmesi ve tedavi amaçlı sık kullanılmasının sonucu olarak oldukça artmıştır (47).

TEM grubu beta laktamazların 1963’de Temoneriae adlı hastadan izole edilmesinin ardından pek çok yeni türevleri ortaya çıkmıştır. TEM genleri genellikle farklı dağılım ve sıklık göstermektedir. TEM-3, TEM-4, TEM-10, TEM-12, TEM-21, TEM-24, TEM-26 ve TEM-52 dünyanın belirli bölgelerinde yaygın olan TEM beta laktamazlardandır. Bu durumdan türler arasında farklı transpozon ve plazmidlerin dağılımı sorumludur. Örneğin TEM-1 dağılımından Tn-1,-2,-3 ve IncC plazmidleri gibi farklı grup mobil gen elemanları sorumlu iken, TEM-2’nin dağılımından IncFI, IncA/C ve IncP gibi plazmidler sorumlu tutulmuştur (134, 135, 136). Yapılan çalışmalar sonucunda TEM GSBL’de konjuge olabilen epidemik plazmidler saptanmıştır. TEM tipi GSBL’nin bir üyesi olan TEM-24 ilk olarak *K. pneumoniae*’de 1988’li yıllarda tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda ise *E. coli*’ninde dahil olduğu çok çeşitli *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Aeromonas* spp. ve *P.aeruginosa*’da saptanmıştır. Bu enzimin Avrupa’nın farklı ülkelerinde dağılımından sıklıkla *Enterobacter aerogenes* klonuna ait izolatların salgın ya da salgın dışı durumlarının fazlaca gözlenmesi sorumlu tutulmuştur. Belçika, Fransa, Portekiz ve İspanya’da TEM-24 yayılımı; 1990’dan bu yana Avrupa hastanelerinde çoğul ilaca dirençli *E. aerogenes*’de dahil olmak üzere diğer enterobakterilerde klonal yayılım şeklinde gözlenmiştir (137). Lavinge ve ark.’nın Fransa’da yapmış oldukları bir çalışmada TEM-3 ve TEM-24 baskın tipde GSBL geni pozitifliği %90 oranında saptanmış ve GSBL gen oranları TEM-24 için %47.5, TEM-3

için %42.5, CTX-M-15 için %5, CTX-M-3 ve CTX-M-14 için %2.5 olarak saptanmıştır. GSBL üretim prevalansı *E. coli* için *E. aerogenes*'e göre oldukça düşük (%0,71/%17,9) bulunmuştur. Yapılan PFGE sonucuna göre; plazmid aracılı TEM-3 ve TEM-24 yayılımı *E. coli*'de klonal ilişkisiz olarak tespit edilirken *E. aerogenes*'de klonal yayılım şeklinde saptanmıştır (138). Kore'de yapılan bir çalışmada TEM-52, *E. coli*'de yaygın bulunan TEM tipi beta laktamaz olarak saptanmıştır (139). Yapmış olduğumuz bu çalışmada TEM beta laktamazı sadece 2 izolat da yalnız saptanmış olup tüm izolatlar ele alındığında sıklıkla CTX-M geni ile birlikte olacak şekilde %59.2 oranında saptanmıştır.

SHV beta laktamazlardan olan SHV-1 sıklıkla *K. pneumoniae*'nin kromozom yapısında bulunur. SHV-1 varyantı olan enzimler genellikle *E. coli*'yi konak gibi kullanarak *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerine ve *P. aeruginosa*'ya plazmid aracılı aktarılırlar. Penisilinaz, GSBL ve inhibitörlere dirençli beta laktamaz özelliğinde 143 SHV-1 varyantı mevcuttur (4, 6, 50). 2003'de *Klebsiella* çalışma grubu tarafından bakteriyemi etkeni *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan GSBL gen taramalarında baskın gen olarak SHV %67.1 olarak saptanırken; TEM %16.4 ve CTX-M %23.3 oranında saptanmıştır. Bu çalışma aynı zamanda ülkemize ait izolatlarda ilk defa SHV-5 ve CTX-M genlerinin saptandığı bir çalışma idi (140). *E. coli*'de SHV gen taramaları genellikle düşük prevalanslı sonuçlanmıştır. Norveç'de 2003'de yapılmış bir çalışmada 19 *K. pneumoniae*'nin 15'inde SHV-5, -12, -28 ve -2, -2a olacak şekilde çok çeşitli SHV varyantları saptanmakla birlikte, 50 *E. coli* izolatının sadece ikisinde SHV-5 saptanmıştır (141). İsviçre'de 60 izolatda yapılan SHV gen taramalarında ise sadece 7 *E. coli* izolatında SHV-2, SHV-2a, SHV-12 saptanmıştır (142). Portekiz'de *E. coli*, *Klebsiella* spp. , *Enterobacter* spp. ve *Proteus* spp.'nin beta laktamaz gen açısından tarandığı çalışmada TEM geni tüm izolatlarda saptanmakla birlikte; SHV geni sadece *K. pneumoniae*'de SHV-2, -5, -12, -55, -90, -91 şeklinde saptanmıştır (143). Ülkemizde ise Taşlı ve ark.'ı tarafından PZR-RFLP metodunu kullanarak yapmış oldukları çalışmada *Klebsiella* izolatlarında daha sık olmakla birlikte *E. coli*'de SHV-12, SHV-2 ve SHV-5 saptanmıştır (144). Goyal ve ark.'nın Hindistan'da yapmış oldukları çalışmada *E. coli*'de SHV enzimlerini sıklıkla CTX-M ya da diğer beta laktamazlar ile birlikte olacak şekilde %32.9 oranında ve diğer beta laktamazlardan CTX-M %85.4, TEM ise %54.9 olarak saptamışlardır (124). Yapmış olduğumuz çalışmada ise SHV beta laktamazı hiçbir izolatda tek başına bulunmadı. SHV/CTX-M birlikteliği bir izolat ve

TEM/SHV/CTX-M birlikteliği ise 3 izolatta saptandı. SHV beta laktamaz sıklığı diğer beta laktamazlar ile birlikte olacak şekilde %11.8 oranında saptandı.

OXA beta laktamazlar; oksasilin ve kloksasilini penisilinlerden daha fazla hidroliz ettikleri için bu adı almışlardır. Grup 2d ve sınıf D beta laktamazlardan olan bu grup beta laktamazların; dar spektrumlu, GSBL fenotipi gösteren geniş spektrumlu ve karbapenem hidrolizi gösteren varyantları mevcuttur. Grup 2de olup GSBL fenotipi gösteren varyantları; OXA-2 ve OXA-10'dan köken alırlar ve genellikle *P. aeruginosa*'da izole edilirler. OXA-2 enzimi; OXA-3 ve GSBL fenotipi gösteren OXA-15, OXA-21, OXA-32, OXA-34, OXA-36 ve OXA-53 varyantlarını içerir. OXA-10 enzimi ise OXA-7 ve GSBL fenotipli OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-28, OXA-35 varyantlarını içerir. Grup 2df OXA beta laktamazlardan olan OXA-23 benzeri, OXA-24 benzeri, OXA-48, OXA-51 benzeri ve OXA-58 benzeri varyantlar ise oksasilin ve kloksasiline ek olarak karbapenemleri de hidroliz eder. Sıklıkla *Acinetobacter* spp. ve *K. pneumoniae*'de izole edilirler. Özellikle OXA-48 ülkemizde yaygın olan ve karbapenem hidroliz özelliği olan beta laktamazlardandır (54). İlk olarak ülkemizde seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'da saptanan OXA-10 varyantı enzimlerden olan OXA-15 ve OXA-14; ana enzimle kıyaslandığında geniş spektrumlu sefalosporin hidrolizi gösteren GSBL tipi bir enzim olarak tanımlanmışlardır (145, 146). Aktaş ve ark.'ı seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında yapmış oldukları PER-1 ve OXA-10 taramalarında PER-1 genini %86 (42/49) ve OXA-10 genini ise %55 (27/49) gibi yüksek oranda ve klonal ilişkisi olmayan izolatlar olarak saptamışlardır (147). Kiratisin ve ark. Tayland'da nozokomiyal GSBL üreten *E. coli* izolatlarında yapmış oldukları çalışmada ise GSBL olmayan OXA-10 grup beta laktamazını %8.1 oranında saptamışlardır (102). Bizim çalışmamızda ise OXA-2 grup; 12 (%15.8) izolatda ve OXA-10 grup ise sadece 3 (%3.9) izolatda saptanmıştır. Bu enzimler hiçbir izolat da tek başına izole edilmemiştir.

PER beta laktamazlar ilk olarak bir Türk hastaya ait *P. aeruginosa* suşunda PER-1 şeklinde saptanmıştır (148). İzleyen yıllarda Türkiye'de *E. coli* ve *Salmonella paratyphi* tip B suşunda PER-1 olarak ve Güney Amerika'da *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* ve *Salmonella typhimurium* suşlarında PER-2 olarak elde edilmiştir (68). Sonraki yıllarda Cezayir'de PER-1 geni; genetik olarak birbiri ile ilişkili ve klonal yayılım gösteren *P. vulgaris*'de saptanmıştır (149). Ülkemizde ilk olarak Vahaboğlu ve ark.'nın 1997'de sekiz farklı merkeze ait nozokomiyal izolatlarda kolon hibridizasyon ve izoelektrik fokuslama yöntemine göre yaptıkları çalışmada PER-1; *Klebsiella*

türlerinde hiç saptanmazken; *Acinetobacter* spp.'de %46 ve *P. aeruginosa*'da %11 oranında saptanmıştır (150). Kolaylı ve ark.'nın 2005'de yapmış olduğu PER-1 beta-laktamaz taramalarında; *Acinetobacter* spp.'de %55.4 ve seftazidim dirençli *P. aeruginosa*'da %31 oranında yaygın olarak saptanmıştır (151). Eraç ve ark.'nın yoğun bakım izolatlarında yapmış olduğu PER enzim taramasında ise *P. aeruginosa* suşlarının %46.2'sinde ve *A. baumannii* suşlarının %35.9'unda PER-1 varlığı belirlenirken; *Enterobacteriaceae*'nin hiçbirinde PER enzimini saptamamışlardır (152). İtalya'da yapılan bir çalışmada ise PER enzimi bulunduran *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan PFGE sonucuna göre klonal ilişki saptanmıştır (153). Çalışmamızda PER enzimi 11 izolatda, %14.5 oranında ve hiçbir izolatda tek başına olmayacak şekilde saptanmıştır.

GES beta laktamazlar integron ve gen kasetleri şeklinde yayılım göstermesi nedeniyle tehlike gösteren enzimlerdendir. GES beta laktamazlar ilk olarak 1998 yılında Fransa'da bir aylık çocuğun rektal örneğinden elde edilen *K. pneumoniae*'de rapor edilmiştir. Sınıf-1 integron ailesinden In52 plazmidi tarafından kodlanan bu gen; aynı zamanda aminoglikozid, trimetoprim ve dezenfektanlara direnç genlerini de bünyesinde bulundurmaktadır ve beta-laktam antibiyotiklerin seçici baskısı altında kolayca başka patojenlere yayılım özelliği göstermektedir (154). *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter* spp. gibi Gram negatif bakterilerde artarak rapor edilmektedir. GES varyantı enzimler Fransa, Yunanistan, Portekiz, Güney Afrika, Arjantin, Kore ve Brezilya'da tanımlanmıştır (71). Endişe verici bir durum olarak ayrı bir integron ile kodlanan GES-1 ve VIM-11 beta laktamazları üreten *P. aeruginosa* ve GES-7 ve VIM-2 enzimi üreten *E. coli* suşları Yunanistan ve Arjantin'de özellikle çoğul ilaca dirençli suşlarda saptanmıştır (155, 156). Ülkemizde ilk olarak GES enzim taraması Hoşoğlu ve ark. tarafından yapılmıştır. Seftazidim MİK>2 µg/ml olan *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında TEM, SHV, GES enzim taramalarının yapılmış olduğu bu çalışmada; *E. coli*'de TEM %65.1 ve SHV %28.6 olarak saptanmış, izolatların hiçbirisinde GES enzimi saptanmamıştır (157). Kore'de GSBL prevalansını saptamak amaçlı nozokomiyal izolatlarda yapılan taramalarda; *E. coli*'de CTX-M-15 ve CTX-M-3 ve *K. pneumoniae*'de SHV-12 ve CTX-M-3 daha sık bulunmuş ve sadece iki *K. pneumoniae* izolatında GES-3 ve SHV-12 enzimi birlikte bulunmuştur (158). Portekiz'de Duarte ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada hastanelerinde salgına neden olan *K. pneumoniae* izolatlarında plazmid ya da integron lokalizasyonlu GES-1 enzimini saptamışlar ve yaptıkları PFGE ile izolatların birbirleri ile aynı restriksiyon paterni gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (159). Yine Kiratisin ve ark.'nın yapmış

oldukları çalışmada PER ve GES enzimi hiçbir *E. coli* izolatında saptanmamıştır (102). GES beta laktamazlarda diğer önemli sorun 493. pozisyonundaki Gly170'de meydana gelen değişimle karbapenemaz özelliği gösteren varyantların ortaya çıkabilmesidir. GES-2, GES-4, GES-5, GES-6 ve GES-14 bunlardan bir kaçıdır (71). Kore'de yakın zamanlarda yapılmış olan bir çalışmada yaşlı ve kronik hastalığı olup bakım evlerinde kalan bir hastada, CTX-M-15 üreten ST131 *E. coli* klonunda; IncF plazmidi ve sınıf 1 integronunda lokalize GES-5 beta laktamazı saptamışlardır. İntegronun yapılan analizi sonucunda; [*bla*GES-5–*aac*(6-)–IIa–*bla*OXA-17/*orf4*] üçlü gen kaseti şeklinde saptanmış ve bu durumun tehlikeli bir şekilde yayılıma sebep olacağından bahsedilmiştir (160). Çalışmamızda Ryoo ve ark.'ı, Kiratisin ve ark.'nın çalışması ile uyumlu olacak şekilde hiçbir izolat da GES enzimi saptanmamıştır.

Diğer integron ile kodlanan enzim VEB enzimidir. İlk olarak 1999'da Vietnamlı bir kız çocuğunda izole edilen VEB enzimi; PER-1 ve PER-2 ile DNA homolojisi gösteren ve GES enzimi gibi sınıf 1 integron ile birlikte diğer direnç determinantlarını içeren gen kasetleri şeklinde kodlanan enzim olarak tanımlanmıştır (69). Tayland ve Vietnam gibi Uzak doğu ülkelerinde yaygındır. Cao ve ark.'ı Tayland'da *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. mirabilis* izolatlarının GSBL enzim taramalarında VEB için %25.5, CTX-M için %25.5, SHV için %38.1 ve TEM için ise %76.3 sıklıkta ve poliklonal şekilde yayılım gösterdiğini saptamışlardır (161). VEB enzimi Fransa, Tayland ve Kanada'da enterobakteriyel izolatlarda sıklıkla plazmid aracılı kinolon direnç geni *qnrA* ile birlikte bulunmuştur (162). Ülkemizde ise ilk VEB-1 enzimi; Nazik ve ark.'nın 2005'de yapmış oldukları GSBL üreten izolatlarda *qnrA* taramalarında saptanmıştır. Bu araştırmada *C. freundii* suşunda VEB-1 enzimi *qnrA* ile birlikte aynı plazmidde tanımlanmıştır (163). Son olarak Nazik ve ark.'nın 2011'de yapmış oldukları çalışmada; karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının tümünde OXA-48 enzimi saptamakla birlikte sadece dört izolatda VEB-1, SHV ve CTX-M enzimi saptanmıştır. Yine bu çalışmada VEB-1 enzimi bulunduran izolatlar yapılan PFGE yöntemine göre klonal olarak yakın ilişkili olarak tanımlanmıştır (164). İntegron lokalizasyonlu VEB-1 enzimi üreten izolatlar başlangıçta Güneydoğu Asya'da *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'da tanımlanmakla birlikte son yıllarda Fransa ve Belçika'da VEB-1 enzimi üreten *A. baumannii* izolatlarının klonal yayılımı şeklinde saptanmıştır (165, 166). Yine aynı şekilde Kore'de VEB-1 enzimi üreten *P. mirabilis* izolatlarının neden olduğu nozokomiyal salgınlar saptanmıştır (167). Sadece *E. coli* izolatlarının tarandığı çalışmamızda VEB enzimi hiçbir izolat da saptanmamıştır.

CTX-M üreten *E. coli* sıklıkla toplum kaynaklı üriner sistem ve bakteriyemik infeksiyonların önemli bir sebebi olarak tüm dünyada yayılmakta ve tehlike oluşturmaktadır. Geçtiğimiz son on yılda epidemik plazmidler ile yaygınlaşan CTX-M tip GSBL'ler Avrupa, Kanada ve Asya'da TEM ve SHV tip GSBL'nin yerini almıştır. Grup1 içinde bulunan CTX-M-15 ilk olarak 1999'da Hindistan izolatında tanımlanmasının ardından günümüzde tüm dünyada yaygınlaşmış durumdadır (103, 168). Epidemik CTX-M tipi GSBL Amerika'da başlangıçta; bulunmamakla birlikte, günümüzde *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae*'de artarak gözlenmektedir. Teksas'da 2000'de yapılan bir çalışmada %25 oranında CTX-M tip genler bulunurken, 2004'de %69 olarak dominant duruma geçmiştir ve en yaygın CTX-M-15 olmak üzere; CTX-M-16,-8 ve -14 saptanmıştır. CTX-M üreten izolatlar sıklıkla idrar izolatlarında ve *E. coli*'de olmakla birlikte *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *P. mirabilis* ve *Morganella morganii*'de saptanmıştır (169).

European Antibiotic Resistance Surveillance System (EARSS) raporuna göre 2002-2008 yıllarında üçüncü kuşak sefalosporin direnci özellikle invaziv *E. coli* izolatlarında olmak üzere tüm Avrupa'da artmış durumdadır. CTX-M-15 tipi GSBL üreten *E. coli* özellikle İngiltere ve İspanya gibi ülkelerde ST131 epidemik klon olarak saptanmış durumdadır (134, 170, 171). “Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends” (SMART) raporuna göre Asya/pasifik bölgesinde GSBL üreten *E. coli* oranı %34.9 ile %42.2 arasında değişmektedir. Hindistan ve Çin'de GSBL oranları %79 ve %54 oranları ile oldukça fazla oranlarda gözlenmektedir. Yine bu ülkelerde baskın gen olarak CTX-M-15 ve özellikle Tayland ve Vietnam'da ise ek olarak VEB enzimleri saptanmıştır (172, 173). Kiratisin ve ark.'nın 2008'de Tayland'da yapmış oldukları çalışmada GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin dünyada hızlı bir şekilde yayıldığı ve bu durumun hastane infeksiyonları için ciddi bir tehlike oluşturduğu ifade edilmiştir. GSBL gen prevalansı CTX-M için %99.3 (CTX-M-14,-15,-27,-40 ve-55 olarak), TEM için %77 (hepsi TEM-1 olmak üzere), SHV için %3.8 (SHV-11 ve -12), VEB-1 için %8.5 ve OXA-10 için ise %8.1 olarak saptanmakla birlikte izolatların hiçbirisinde PER ve GES enzimleri saptanmamışlardır. Yapılan PFGE analizinde izolatlar arasında major klonal ilişki saptanmayan bu çalışmada CTX-M geni taşıyan izolatların Tayland'da oldukça yüksek endemisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (102). Metallo-beta laktamazların yaygın olduğu Hindistan'da Gram negatif sepsisli hasta izolatları ile yapılan çalışmada; *E. coli* sepsise neden olan en yaygın izolat olarak tanımlanmış ve *E. coli* izolatlarının GSBL oranı %7.3, MBL oranı ise %12.2 olarak

saptanmıştır. CTX-M-15 ve TEM-1 beta laktamazın saptandığı izolatlarda SHV geni ise saptanmamıştır (174). Ülkemizde ise Gür ve ark.'nın 2004 ve 2005 yıllarında *E. coli* izolatlarında yapmış oldukları GSBL gen taramalarında GSBL oranı %26 olarak ve CTX-M gen sıklığı ise %71.4 ile en yaygın GSBL olarak saptanmıştır. Ardından TEM beta laktamazı %49.4, SHV beta-laktamazı ise %46.7 olarak saptanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada kan izolatlarında bulunan CTX-M; %69.4 CTX-M-15, %28.6 CTX-M-3 ve %2 CTX-M-1 olarak saptanmıştır (175). Nazik ve ark.'ı *K. pneumoniae* izolatlarında %85 oranında CTX-M saptamışlardır (176). Gönüllü ve ark.'ı farklı GSBL enzimleri bulunduran klonal olarak birbirine benzemeyen *E. coli* izolatlarında %86.8 oranında CTX-M-1 grubu enzimler saptamışlar ve yapılan sekans, plazmid analizi ve transkonjugasyon çalışmalarında tüm CTX-M-1-grup bulunduran izolatları; CTX-M-15 ve *ISEcp1* insersiyon elementi ile ilişkili olarak bulmuşlardır (177). Öksüz ve ark.'ı ise GSBL üreten *E. coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta laktamaz oranlarını sırasıyla %66.7, %25, %83.3 olarak saptamışlardır (178). Bayraktar ve ark.'ı yakın zamanda yapmış oldukları çalışmada hastane ve toplum kökenli izolatlar arasında anlamlı bir fark olmayacak şekilde CTX-M gen prevalansını %92.5 ve %95.7 olarak yaygın bulmuşlardır (179). Yapmış olduğumuz bu çalışmada ülkemiz ve dünya genelinde yayınlanan oranlara benzer şekilde CTX-M oranları %89.5 olarak yüksek bulunmuştur. İzolatların 20'sinde CTX-M geni tek başına GSBL geni olarak saptanmıştır. Bu durum özellikle tüm dünyada bahsi geçen CTX-M pandemisinden hastanemizde etkilenmiş olabileceğini göstermektedir.

Son yıllarda GSBL üreten *E. coli*'de karbapenem direncine nadir de olsa rastlanmaktadır. *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinden; ESAC olarak adlandırılan AmpC beta laktamazlar, dış membran proteinlerden olan OmpC ve OmpF defekti, OXA ve GES varyantı beta laktamazlar sorumlu olabilir (180). Avrupa Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2004-2009 çalışmasında *K. pneumoniae*'ye kıyasla *E. coli* GSBL oranlarında iki kat artış saptanmıştır. Bu çalışmada Yunanistan'da *K. pneumoniae* için imipenem ve meropenem direnci diğer *Enterobacteriaceae* ile kıyaslandığında oldukça yüksek %13.8 ve %42.6 olarak saptanmıştır (181). Ülkemizde ise Kiremitçi ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları %100 olarak saptanırken, ertapenem için %97.5 olarak saptamışlardır (182). Kuzucu ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada ise *E. coli* izolatlarında ertapeneme %99.2 ve İmipenem ve meropeneme ise %100 duyarlılık saptanmıştır

(183). Yapmış olduğumuz bu çalışmada imipenem ve meropenem duyarlılığı önceki çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde %100 bulunmuştur. Ancak ertapenem duyarlılığı %83 şeklinde daha düşük olarak saptanmıştır. Ertapenem ve diğer karbapenemler arasındaki duyarlılık farkı istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu durumdan hastane infeksiyonu etkeni izolatlarda yaygınlaşan karbapenemaz tipi beta laktamazlar ya da diğer direnç mekanizmaları sorumlu tutulabilir.

GSBL'lar sıklıkla diğer antimikrobiyallere direnç oluşturan genleride içeren aynı plazmidde taşınmaktadırlar. Bu nedenle GSBL üretimi ile birlikte kinolon, trimetoprim/sulfametaksazol ve gentamisine dirençte anlamlı derecede artış ya da çapraz direnç söz konusu olabilmektedir (184, 185). Kinolonlara dirençte sıklıkla DNA giraz enzim değişiklikleri sorumlu tutulmakla birlikte diğer direnç mekanizmalarından olan plazmid aracılı kinolonlara direnç oluşturan genlerden *qnrA* ve *qnrB* genleri de etkili olabilmektedir (186). İspanya'da GSBL üreten izolatlarda yapılan *qnr* gen taramalarında; *qnr* genleri, GSBL genlerinden CTX-M-9 ve SHV-12 ile aynı plazmidde saptanmıştır ve bu durumun GSBL üreten izolatlarda kinolonlara dirençte artışa neden olabileceği sonucuna varılmıştır (187). Tunçcan ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada GSBL üreten izolatlarda diğer grup antibiyotiklere yüksek direnç oranları ile birlikte kinolonlara duyarlılığı %50, trimetoprim duyarlılığı %64 olarak saptanmıştır (185). Al-muhtaseb ve ark.'ı kinolon, trimetoprim-sülfametoksazol ve gentamisine duyarlılığı oldukça düşük (%15, %25, %35) olarak bulunmuştur (188). Öksüz; *E. coli* suşlarında kinolon, trimetoprim-sülfametoksazol ve gentamisine duyarlılığı (%25, %17, %58) çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre daha düşük (kinolon ve trimetoprim-sülfametoksazol için) olacak şekilde saptamışlardır (178). Hastanemizde; daha önce yapılan çalışmalarda GSBL üreten *E. coli* izolatlarında kinolon, trimetoprim-sülfametoksazol ve gentamisine duyarlılığı (%28.4 ile %62.8, %26.4 ile %47.9, %47.7 ile %73.3) aralığında saptanmıştır (116, 183). Yapmış olduğumuz bu çalışmada kinolon, trimetoprim-sülfametoksazol ve gentamisine duyarlılığı sırasıyla %41, %29, %50 olacak şekilde sözü edilen çalışmalarda olduğu gibi düşük bulunmuştur. Suşların kinolon duyarlılığı TEM/CTX-M birlikteliğinde %44 ve yalnız CTX-M geni varlığında daha düşük (%25) olarak saptanmakla birlikte aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

GSBL üreten *E. coli* izolatlarının geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlılıkları değişmektedir. Hoban ve ark.'nın 2004 yılında yapmış olduğu Asya, Avrupa ve Güney Amerika'nın dahil olduğu TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial)

programında, GSBL üreten *E. coli* için seftazidim, sefepim ve seftriakson duyarlılıkları sırasıyla %20.8, %50 ve %20.8 olarak saptanmıştır (189). Ülkemizde ise Zarakolu ve ark.'ları sefepim ve seftazidim duyarlılığını 2004 yılı için %65 ve %63 olarak saptamışlardır (112). Yakın zamanda hastanemizde yapılmış bir çalışmada ise seftazidim, sefepim ve seftriaksona duyarlılıkları sırasıyla %21, %21 ve %5 olarak saptanmıştır (190). Yapmış olduğumuz bu çalışmada seftazidim ve sefepim duyarlılığı tüm izolatlar için %18 ve %25 olarak saptanmakla birlikte artan CTX-M gen oranına paralel olacak şekilde hiçbir izolatda sefotaksim ve seftriakson duyarlılığına rastlanmamıştır.

Tayvan'da GSBL üreten *K. pneumoniae* için sefepim MİK seviyesinin $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ olmasının; CTX-M enziminin yokluğu açısından ön tahmin olabileceği şeklinde bir sonuca bağlandığı çalışmada sefepim duyarlılığı %53 olarak saptanmıştır (191). Song ise 2010 CLSI'ya göre farklı GSBL üreten izolatları değerlendirdiği bir çalışmada Tayvan'da yapılan çalışmanın aksine sefepim duyarlılığını %75.5 olarak saptamıştır (192). Yine Song'un yapmış olduğu çalışmada CTX-M-14 üreten 4 izolatın tamamı sefotaksime dirençli ve seftazidime duyarlı olarak saptanmıştır. Yalnız CTX-M-15 ve birlikte bazı beta laktamazların üretildiği izolatların tamamı sefotaksim ve seftazidime dirençli olarak saptanmıştır (192). Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise Song'un çalışması ile uyumlu olacak şekilde sefotaksime tüm izolatların dirençli olduğu saptanmıştır. Seftazidim duyarlılığı yalnız CTX-M bulunduran izolatlarda %15, TEM/CTX-M bulunduran izolatlarda %16 olarak birbirine yakın değerlerde ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayacak şekilde saptanmıştır.

CLSI; GSBL tanımlanması ve doğrulanması için sefotaksim ve seftazidim disklerini klavulanik asitle ve tek başına kullanılmasını tavsiye etmektedir. CTX-M beta laktamazlar genellikle sefotaksimaz olarak bilinmekle birlikte Asp240Gly değişiklikleri ile seftazidime karşı hidroliz özelliği gösterebilmektedir. Amerika'da CTX-M üreten izolatlarda seftazidim ve sefotaksim zon çaplarının karşılaştırıldığı bir çalışmada *K. pneumoniae* için belirgin fark saptamazken, *E. coli* için sefotaksim zon çapı, seftazidim zon çapına göre yaklaşık 7.1 mm daha küçük olarak saptamışlardır. Yine bu çalışmada CTX-M üretmeyen *E. coli* izolatları için ortalama zon çapları ise sefotaksim için 21 mm iken, seftazidim için 17.3 mm olarak saptanmıştır (169). Yapmış olduğumuz bu çalışmada zon çapları değerlendirilmemekle birlikte özellikle yalnız CTX-M üreten 20 izolat sefotaksim ve seftriaksona tamamiyle dirençli ve seftazidime ise %15 oranında duyarlı bulunmuştur. TEM/CTX-M ya da CTX-M gen varlığına göre sefotaksim ve

seftriakson ile seftazidim, sefepim ve aztreonam duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Ancak seftazidim, sefepim ve aztreonam duyarlılık arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

Beta laktam/beta laktamaz inhibitörlerine direnç; GSBL için spesifik olmamakla birlikte; beta laktamaz inhibitörlerinin tedavide sık kullanılması ve inhibitörlere direnç fenotipi gösteren TEM ve SHV kökenli enzimler nedeniyle gözlenebilmektedir (4, 50). Beta laktam/beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına duyarlılıkla ilgili yapılmış çalışmalarda değişik sonuçlar bildirilmiştir. Kuzucu ve ark.'ı piperasilin/tazobaktam ve sefaperazon/sulbaktam duyarlılıkları %59.4 ile %66.5 olarak saptamışlardır (183). Ayrıca Tunçcan ve ark.'ı piperasilin/tazobaktam, sefaperazon/sulbaktam ve amoksisilin/klavulanata duyarlılığı %77, %95 ve %45 olarak ve Al-Muhtaseb ve ark.'ı ise %65, %90 ve %10 olarak saptamışlardır (185, 188). Çalışmamızda piperasilin/tazobaktam ve sefaperazon/sulbaktam duyarlılığı Kuzucu ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmaya benzer şekilde %61, %64 olarak ve amoksisilin klavulanat duyarlılığı ise %20 olarak bulunmuştur. Piperasilin/tazobaktam ve sefaperazon/sulbaktam duyarlılık, amoksisilin/klavulanat duyarlılığına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur. TEM/CTX-M ya da CTX-M gen varlığına göre ise tüm beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarına duyarlılık; TEM/CTX-M birlikteliği olan izolatlarda, yalnız CTX-M bulunduran izolatlara göre daha düşük saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Beta laktamaz inhibitörlerine olan duyarlılığın azalmasından beta laktamaz enzimlerinden plazmid aracılı AmpC beta laktamazlar, grup 2ber ve grup 2br beta laktamazlar (CMY, CMT, IRT) ve inhibitörlere dirençli SHV enzimleri sorumlu olabilir (51, 52). Ancak çalışmamızda bu enzimleri kodlayan gen taramaları ve sekans çalışmaları yapılmamıştır.

GSBL üreten izolatların neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlar GSBL'nin ilk olarak tanımlandığı yıllarda özellikle pediatrik yoğun bakım ünitelerinde mukozal yüzeylerde ve cansız yüzeylerde uzun süreli canlı kalabilme özelliği nedeniyle *K. pneumoniae* salgınları şeklinde ortaya çıkmaktaydı (4, 50). *E. coli* ise genellikle hastanın kendi florasından kaynaklandığı gibi 1.5 saat ile 16 ay kadar süre cansız yüzeylerde yaşayabilen bir bakteri olması nedeniyle, yeterince infeksiyon kontrol kurallarına uyulmadığı durumlarda salgınlara neden olabilmektedir (9, 193, 194).

GSBL üreten izolatların neden olduğu infeksiyonların belirli bir zaman aralığında fazla miktarda gözlenmesi salgın şeklinde yorumlanabilir. Salgınlar

genellikle GSBL üreten izolatın hasta-hasta, hasta-çevre ya da hasta-personel şeklinde teması ile klonal yayılım şeklinde olabileceği gibi plazmid, transpozon ve integronlar gibi mobil gen elemanları ile GSBL direnç genlerinin ilişkisiz suşlar arasında aktarılması şeklinde de ortaya çıkabilir (193, 194). *E. coli* klasik olarak poliklonal bir patojen olmakla birlikte Multilokus Sekans Tiplemeye göre ST131 olarak tanımlanan epidemik CTX-M-15 üreten *E. coli* suşunun klonal yayılımı GSBL üretiminin son yıllarda artış göstermesinin major bir nedeni olarak sunulmaktadır (8). Yakın zamanda yapılmış çalışmalara göre Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da sekiz ülkeden elde edilen hastane ve toplum kaynaklı izolatlarda CTX-M 15 üreten *E. coli* suşlarının klonal görünümünün oldukça benzer olduğu gösterilmiştir (195).

Mendonça ve ark.'nın Portekiz'de farklı hastanelerden elde etmiş oldukları GSBL üreten *E. coli* izolatları ile yapmış oldukları bir çalışmada PFGE analizine göre izolatları %80 benzer bulmuşlardır. Özellikle bir hastanede klonal yayılım şeklinde salgın tespit etmekle birlikte toplum kökenli izolatlar ve farklı hastanelere ait izolatların bir kısmını birbirlerine benzeyen klonlar olarak saptamışlardır. Bu durum ülkede çoğul ilaca dirençli CTX-M-14 ve CTX-M-15 bulunduran klonun yaygınlığının bir göstergesi olarak sunulmuştur. Bu çalışma hastaneler, toplum ve bölgeler arasında CTX-M üreten izolatların mobil elemanlar veya plazmidlerin transferiyle yayıldığını desteklemektedir (196).

Ülkemizde ise Yumuk ve ark.'nın toplum kaynaklı GSBL üreten *E. coli* izolatlarında yapmış oldukları PFGE analizinde oldukça farklı klonlar olarak saptanmakla birlikte CTX-M üreten izolatlar üç küme oluşturacak şekilde saptanmıştır. Bunlardan ikisi CTX-M-15, bir tanesi de CTX-M-3 diğeri de SHV-12 üretimi ile ilişkilidir. Aynı zamanda tüm CTX-M üreten izolatların kinolonlara direnci diğer genlere göre oldukça anlamlı olacak şekilde yüksek bulmuşlardır (197). İspanya'da hastane kökenli izolatlarda yapılan gen taramalarında CTX-M-15 en sık olacak şekilde aynı kümede birbirine benzer olarak ve pandemik klon O25;H4:ST131 olarak saptanmıştır. İkinci kümeyi ise CTX-M-14 taşıyan izolatlar oluşturmuş, diğer izolatlar ise klonal ilişkisiz olarak saptanmıştır (171). Lau ve ark. CTX-M üreten *E. coli* izolatları ile yapmış oldukları bir çalışmada; multilokus sekans tiplemeye göre ST131 olmakla birlikte oldukça farklı PFGE profili gösteren suşlar saptamışlardır. Aynı zamanda bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi GSBL fenotipi göstermesine rağmen beta laktamazları kodlayan direnç geninin saptanmadığı izolatlar gösterilmiştir (198). Yine İspanya'da infeksiyon ya da kolonizasyon etkeni GSBL üreten *E. coli*

izolatları ile yapılan bir çalışmada tüm isolatlar birbirlerinden oldukça farklı olarak saptanmış ve direnç genlerinin isolatlar arasında plazmidler ile aktarılmış olabileceği sonucuna varılmıştır (118). Yapmış olduğumuz bu çalışmada isolatların %19'u kümeleşme göstermekle birlikte baskın klon saptanmadı ve Kiratisin, Lau ve Pena'nın çalışmaları ile uyumlu olacak şekilde isolatlar arasında klonal ilişki saptanmadı. İlişkisi olan isolatlarda epidemiyolojik yönden herhangi bir bağlantı bulunamadı.

Sonuç olarak; bu çalışmada nozokomiyal *E. coli* isolatlarının yapılan beta laktamaz gen taramalarında CTX-M oldukça yüksek sıklıkta saptanmıştır. GSBL üreten *E. coli* suşlarında farklı PFGE profili izlenmiştir. Çalışmamızda infeksiyon kontrol önlemlerinin etkili olduğunu gösterecek şekilde hastane kökenli isolatlarda direnç genlerinin mobil ekstrakromozomal DNA elemanları ile aktarılmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte dünyada yaygın olan epidemik klonlar ile plazmidler arasındaki ilişkiyi açıklayacak plazmid analizi ve multilokus sekans tipleme gibi daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada hastane infeksiyonu etkeni GSBL üreten 76 *E. coli* suşunun izole edildikleri bölümler, antibiyotiklere duyarlılıkları, beta laktamaz enzim tipleri ve klonal ilişkisi araştırılmıştır. TEM, SHV, CTX-M, OXA-2 grup, OXA-10 grup, PER, VEB, GES tipi enzimlerin araştırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

1. GSBL üreten *E. coli* izolatları en sık yoğun bakım, dahiliye, genel cerrahi ve üroloji bölümlerinden izole edilmiştir.

2. Suşların yapılan antibiyotik duyarlılık testlerine göre tamamı imipenem, meropenem ve amikaside duyarlı bulunmakla birlikte ertapeneme duyarlılık %83 olarak saptanmıştır.

3. Amoksisilin/klavulanik asite duyarlılık, piperasilin/tazobaktam ve sefaperazon/sulbaktam duyarlılık ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır.

4. Siprofloksasilin, tetrasiklin, trimetoprim/sülfometaksazol duyarlılıkları düşük saptanmıştır.

5. Ampisiline tüm suşlar dirençli bulunmuştur.

6. İdrar izolatlarında karbenisiline tüm suşlar dirençli bulunurken nitrofurantoine duyarlılık %88 olarak yüksek bulunmuştur.

7. GSBL üreten izolatların antibiyotik duyarlılıkları; seftazidime %18, sefepime %25, aztreonam %20 saptanmakla birlikte izolatların hiçbirisi sefotaksim ve seftriaksona duyarlı bulunmamıştır.

8. Suşların beta laktamaz gen prevalansı: CTX-M için %89.5, TEM için %59.2, OXA-2 grup için %15.8, PER için %14.5, SHV için %11.8, OXA-10 grup için %3.9 olarak bulunmuştur. Hiçbir izolatda GES ve VEB beta laktamaz geni saptanmamıştır.

8. Bir izolatda ÇDST ve E testi ile GSBL üretildiği gösterilmekle birlikte, PZR yöntemi ile araştırılan genlerden hiçbirisi bulunmamıştır.

9. Beta laktamaz gen birliktelikleri 25 izolatda TEM/CTX-M, 6 izolatda TEM/CTX-M/PER, 4 izolatda OXA-2 grup/CTX-M olarak saptanmıştır. Yalnız CTX-M bulunduran izolat sayısı 20 ve yalnız TEM bulunduran izolat sayısı 2 olarak saptanmıştır. Hiçbir izolatda SHV beta laktamazı tek başına saptanmamıştır.

10. CTX-M beta laktamazı bulunduran izolatların tamamı seftriakson ve sefotaksime dirençli bulunmuştur. Yalnız CTX-M ile TEM/CTX-M gen varlığına göre seftazidim, sefepim, ertapenem ve kinolona duyarlılıkları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

11. PFGE yöntemiyle 76 *E. coli* suşunun 14'ünün (%19) küme içinde olduğu saptanmıştır. Bu suşlar 7 küme içinde yer almıştır. 69 farklı genotipik profil saptanmıştır. Baskın klon ya da salgın klon saptanmamıştır.

Bu sonuçlara göre hastanemizde GSBL üreten nozokomiyal *E. coli* suşlarında CTX-M gen prevalansı diğer genler ile kıyaslandığında oldukça yüksek saptanmıştır. İzolatlarda farklı PFGE profili izlenmesi nedeniyle direnç genlerinin mobil genetik elemanları ile aktarılmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte epidemik klonlar ile plazmidler arasındaki ilişkiyi açıklayacak plazmid analizi ve Multilokus sekans tipleme (MLST) gibi daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

7. ÖZET

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ÜRETEEN NOZOKOMİYAL *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA BETA LAKTAMAZ GENLERİ VE KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten mikroorganizmalar dünyada önemli bir problemdir ve özellikle CTX-M beta laktamazı üreten *Escherichia coli* tüm dünyada yayılmakta, hem nozokomiyal hem de toplumsal kaynaklı infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı GSBL üreten hastane kökenli *Escherichia coli* izolatlarında beta laktamaz gen prevalansı, antibiyotik duyarlılıkları ve klonal ilişkilerini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde Haziran 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında yatan hastalardan izole edilen toplam 76 GSBL üreten *E. coli* suşu çalışmaya alındı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Klinik Laboratuvar ve Standartlar Enstitüsü'ne (CLSI) göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptandı. GSBL varlığı Çift Disk Sinerji Testi ile saptandı, şüpheli olgularda sefotaksim/sefotaksim klavulanik asit E test şeriti (AB-Biodisk) kullanıldı. TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, OXA-2 grup ve OXA-10 grup beta laktamaz genlerinin varlığı bu bölgelere özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi ile araştırıldı. Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin tespiti için PFGE (pulsed field gel electrophoresis) yöntemi kullanıldı.

Bulgular: GSBL üreten *E. coli* izolatları en sık yoğun bakım (%35), dahiliye (%16) ve genel cerrahi (%13) bölümlerinden izole edildi. GSBL üreten *E. coli*'lerin en sık izole edildiği örnekler idrar (%34), kan (%33) ve yara (%21) olmuştur. Suşların tamamı imipenem, meropenem ve amikasin'e duyarlı bulundu. İzolatların hiçbirisi sefotaksim ve seftriaksona duyarlı bulunmadı. GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının ertapeneme duyarlılığı %83, piperasilin/tazobaktam %61, sefaperazon/sulbaktam %63, seftazidime %18, sefepime %25, aztreonam %20 olarak saptandı. *E. coli* suşlarında CTX-M, TEM, OXA-2 grup, PER, SHV, OXA-10 grup beta laktamaz oranları, sırasıyla %89.5, %59.2, %15.8, % 14.5, %11.8 ve %3.9 olarak saptandı. İzolatların hiçbirinde GES ve VEB beta laktamaz geni saptanmadı. Bir izolatda araştırılan beta laktamaz genlerinden hiçbirisi saptanmadı. PZR analizi sonucu 25 izolatta TEM ve CTX-M beta laktamazu birlikte, 20 izolatta yalnız CTX-M beta laktamaz geni ve 2 izolatta yalnız TEM beta laktamaz geni bulunduğu saptandı. SHV beta laktamazu hiçbir izolatda tek başına saptanmadı. PFGE yöntemi ile GSBL üreten izolatlar arası belirgin klonal ilişki saptanmadı.

Sonuçlar: Bu çalışma ile hastanemizde nozokomiyal GSBL üreten *E. coli* suşları arasında CTX-M tipi enzimin yüksek sıklıkta olduğu gösterildi. GSBL üreten bakterilerin poliklonal olarak yayıldığı saptandı ve baskın epidemik suş tanımlanamadı. Direnç genlerinin mobil genetik elemanları ile aktarılmış olabileceği düşünülerek epidemik klonlar ile plazmidler arasındaki ilişkiyi açıklayacak plazmid analizi ve Multilokus sekans tipleme (MLST) gibi daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, beta laktamaz genleri, CTX-M, PFGE

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF BETA LACTAMASES GENES AND CLONAL RELATEDNESS AMONG THE EXTENDED-SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING-NOSOCOMIAL *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

Objective(s): Extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing microorganisms are a global problem and especially CTX-M beta lactamase-producing *Escherichia coli* has disseminated worldwide as an important cause both nosocomial and community infections. The aim of this study was to assess the types and frequency of the beta lactamase genes and to investigate antibiotic susceptibility and clonal relationship in ESBL-producing hospital isolates of *E. coli*.

Material and methods: A total of seventy-six extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *E. coli* strains isolated from patients hospitalized at Inonu University Turgut Ozal Medical Center between June 2010-June 2011 were evaluated. Antibiotic susceptibilities of isolates were detected by Kirby Bauer disc diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ESBL production was tested by double disc diffusion method. When ESBL production was indeterminate, cefotaxime/ cefotaxime-clavulanic acid E test strip (AB-Biodisk) was used. Existence of TEM, SHV, CTX-M, OXA-2 group, OXA-10 group, PER, VEB and GES beta lactamase genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR) method using primers specific to these sites. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) method was used for detection of clonal relationships between strains.

Results: The frequency of ESBL-producing *E. coli* isolates were detected as 35% from intensive care unit, 16% from internal medicine and 13% from general surgery departments. These isolates were isolated 34% from urine, 33% from blood and 21% from wound specimens. All 76 strains were susceptible to imipenem, meropenem and amikacin. None of the isolates were susceptible to cefotaxime and ceftriaxone. The susceptibility of ESBL positive *E. coli* isolates to ertapenem was 83%, 61% to piperacillin/tazobactam, 63% to cefoperazone/sulbactam, 18% to ceftazidime, 25% to cefepime and 20% to aztreonam. The rates of CTX-M, TEM, OXA-2 group, PER, SHV, OXA-10 group beta lactamases were found as 89.5%, 59.2%, 15.8 %, 14.5%, 11.8% and 3.9% for *E. coli* strains, respectively. None of the isolates were positive for VEB and GES beta lactamases. All the beta lactamase genes were not detected in the only one isolate in the study. CTX-M beta lactamase gene was detected as alone in 20 isolates. The PCR analysis of the 25 isolate revealed that CTX-M coexisted with TEM beta lactamase gene. The number of isolates containing only TEM type beta lactamase gene was found to be two. SHV beta lactamase gene was not found alone in any isolate. Pulsed-field gel electrophoresis analysis demonstrated that there was no major clonal relationship among these ESBL producing isolates.

Conclusions: This study indicated that CTX-M type enzymes were highly endemic among ESBL-producing nosocomial *E. coli* strains in our hospital. The spread of ESBL-producing bacteria detected to be polyclonal and there was not dominant clone or epidemic clone. The resistance genes should be transferred by mobil genetic elements. However plasmid analyse and Multilocus sequence typing (MLST) have to perform for the relationship between epidemic clone and plasmids.

Keywords: *E. coli*, beta lactamase genes, CTX-M, PFGE

9. KAYNAKLAR

1. Doğanay M, Ünal S. Hastane Enfeksiyonları. Hastane Enfeksiyonları Derneği Yayını No.1, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003.
2. Meers PD. Infection control in developing. J Hosp Infect 1998; 11 (A): 406-10.
3. Gürler N. Hastane Enfeksiyonlarına Yol Açan Sorunlu Mikroorganizmalar Nelerdir? Sorun Oluşturma Nedenleri Nelerdir? 2005: 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi.
4. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. Clin Microbiol Rev 2005; 18 (4): 657–86.
5. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2007; 60; 913–20.
6. <http://www.lahey.org/Studies>.
7. Cantón R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 144–53.
8. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol 2006; 9(5):466-75.
9. Bilgehan H. *Enterobacteriaceae* familyası. In: Bilgehan H, ed. Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. Baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi 2000; 1-17.
10. Stenutz R, Weintraub A, Wildmalm G. The structures of *Escherichia coli* O polysaccharide antigens. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(3): 382-403.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby 2009; 301-7.
12. Fındık D. *Escherichia* Türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, ed. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Etkenlere Göre Enfeksiyonlar 2. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008; 2136-47.
13. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med 2002; 8: 113 (Suppl 1A): 5-13.
14. Xie Y, Kim KJ, Kim KS. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 42(3):271-9.

15. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16(3):128-40.
16. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008;36: 309-32.
17. Stamm WE, Weinstein RA, Dixon RE. Comparison on endemic and epidemic nosocomial infections. *Am J Med* 1981;70: 933-40.
18. Aygen B, Kayabaş Ü. Yoğun Bakım Birimlerinde Dirençli Enfeksiyon Sorunu. *Klimik Dergisi* 2001;14,2: 83-8.
19. Stone PW. Economic burden of healthcare-associated infections: an American perspective. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2009; 9(5):417-22.
20. Plowman R, Graves N, Griffin MA, et al. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialities of a district general hospital in England and the national burden imposed. *J Hosp Infect* 2001;47(3): 198-209.
21. Khan MM, Celik Y. Cost of nosocomial infection in Turkey: an estimate based on the university hospital data. *Health Serv Manage Res* 2001;14: 49-54.
22. Esatoğlu AE, Agirbas I, Onder OR, Celik Y. Additional cost of hospital-acquired infection to the patient: a case study in Turkey. *Health Serv Manage Res*. 2006;19(3):137-43.
23. Kong KF, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 2010;118(1):1-36.
24. Akova M, Kayaalp SO. Beta laktam antibiyotikler I: Penisilinler, Beta laktam antibiyotikler II: Sefalosporinler ve Diğerleri. In: Kayaalp SO, ed. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: 2002; 167-99.
25. Rolinson GN. 6-APA and the development of the beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5(1):7-14.
26. Abraham EP. Cephalosporins. 1945-1986. *Drugs* 1987; 34: 1-14.
27. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot* 1979;32(1):1-12.
28. Sykes RB, Cimarusti CM, Bonner DP, et al. Monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature* 1981; 291: 489-91.

29. Giedratiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 2011; 47(3): 137-46.
30. Erill I, Campoy S, Mazon G, Barbé J. Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* 2006;34: 66-77.
31. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, et al. The SOS response controls integron recombination. *Science* 2009; 324: 1034-37.
32. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008;153 (Suppl 1): 347-57.
33. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby 2009; 23-38.
34. Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1): 164-69.
35. Köseoğlu O. Integrons. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(3): 305-12
36. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(4): 272-88.
37. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70(2):296-316.
38. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Curr Opin Microbiol* 2010;13(5):551-7.
39. Džidic S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* 2008; 46: 11-21.
40. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2):234-58.
41. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 361-85.
42. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794(5): 808-16.
43. Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P. Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42(2): 129-33.

44. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1): 82-9.
45. Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(2): 309-27.
46. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 2009; 69(12):1555-623.
47. Bush K and Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3): 969–76.
48. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 161–82
49. Kernodle D S, Stratton CW, McMurray LW, Chipley JR, McGraw PA. Differentiation of β -lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. *J Infect Dis* 1989; 159:103–08.
50. Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933–51.
51. Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 53-62
52. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(12): 2593-601.
53. Potron A, Poirel L, Croize' J, Chanteperdrix V, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3010–16.
54. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 24–38.
55. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3): 470-82.
56. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(12): 1686-1701.
57. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (1): 42–52.

58. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1–4.
59. Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *J Biol Chem* 1993; 268: 3690-97.
60. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 838-40.
61. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis* 1988;10(4): 879-84.
62. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 1-14.
63. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(8): 2269-75.
64. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1): 29-35.
65. Shimizu-Ibuka A, Oishi M, Yamada S, et al. Roles of residues Cys69, Asn104, Phe160, Gly232, Ser237 and Asp240 in extended spectrum β -lactamase Toho-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(1): 284-90.
66. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Toho-2, a Class A β -Lactamase Preferentially Inhibited by Tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(5):1181-86.
67. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 15-22.
68. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R et al. Characterization of β -lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616–20.

69. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 573- 81.
70. Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. A *bla*VEB-1 Variant, *bla*VEB-6, Associated with Repeated Elements in a Complex Genetic Structure. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4); 1693–97.
71. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Pyrosequencing as a rapid tool for identification of GES-type extended spectrum b-lactamases. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3008–11.
72. Silva J, Aguilar C, Ayala G, et al. TLA-1: a new plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 997–1003.
73. Alcantar-Curiel D, Tinoco JC, Gayosso C, et al. Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1067–74.
74. Girlich D, Poirel L, Schluter A, Nordmann P. TLA-2, a novel Ambler class A expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4767–70.
75. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 307–13.
76. Peduzzi J, Farzaneh S, Reynaud A, Barthelemy M, Labia R. Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Serratia fonticola* CUV. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1341(1):58–70.
77. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3061-68.
78. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3743–48.
79. Bogaerts P, Bauraing C, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 5: 1584–85.

80. Poirel L, Docquier JD, De Luca F, et al. BEL-2, an Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 5: 533–5.
81. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum betalactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2206-12.
82. Thauvin-Eliopoulos C, Tripodi MF, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Efficacies of piperacillin-tazobactam and cefepime in rats with experimental intra-abdominal abscesses due to an extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5): 1053-7.
83. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Document M100-S19. Wayne PA; CLSI 2009.
84. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; twentieth informational supplement (June 2010 update). Document M100-S20-U. Wayne PA; CLSI 2010.
85. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4): 867-78.
86. Thomson KS and Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother* 1992; 36: 1877–82
87. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(1): 49-54.
88. Chroma M, Kolar M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154(4): 289-96.
89. Huovinen S, Huovinen P, Jacoby GA. Detection of plasmid mediated beta-lactamases with DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 175–9.

90. Mabilat C, Courvalin P. Development of “oligotyping” for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 34: 2210–16.
91. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Discrimination of SHV beta-lactamase genes by restriction site insertion-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7): 2110-4.
92. Fujita K, Silver J. Single-strand conformational polymorphism. *Genome Res* 1994; 4: 137-40.
93. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, et al. Ligase chain reaction (LCR) – overview and applications. *PCR Methods Appl* 1994; 3: 51-64.
94. Köksal F. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri In: Durmaz R, ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Malatya. 2001; 15-33.
95. Durmaz R. DNA Dizi Analizi. In: Durmaz R, ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Malatya. 2001;169-71.
96. Durmaz R. Dirençli bakteri suşları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi. *Ankem Derg* 2007; 21(Ek 2): 178-83.
97. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(3): 512-30.
98. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5): 372-7.
99. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2233-9.
100. Köksal F. Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane Enfeksiyonlarında Kullanımı. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 1999; 3: 189-195
101. Woodford N. Successful, multiresistant bacterial clones. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 233–4
102. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(8):2818-24.

103. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli* changing epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23(4): 320-6.
104. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 657-68.
105. Gunseren F, Mamikoglu L, Ozturk S, et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 373-8.
106. Wu CJ, Lee HC, Lee NY, et al. Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(2): 135-43.
107. Durmaz B, Sönmez E, Tekerekoğlu MS, Aksüllü N. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp merkezinde Hastane Enfeksiyonları; Mikroorganizmalar ve Çoklu Antimikrobiyal Direnç. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 1996; 3(3): 183-90.
108. Ersoy Y, Fırat M, Kuzucu Ç ve ark. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Hastane Enfeksiyonları. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg*. 2003; 10(3):133-7.
109. Çelik İ, Şenol A, Karlıdağ GE, İnci NA. Fırat Üniversitesi Hastanesi 2006 Yılı Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Sonuçları. *Fırat Tıp Dergisi* 2009; 14(4): 242-6.
110. Leblebicioglu H, Gunaydin M, Esen S, et al; Study Group Surveillance of antimicrobial resistance in gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: analysis of data from the last 5 years. *J Chemother* 2002; 14(2): 140-6.
111. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B; Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(4): 453-7.
112. Zarakolu P, Hasçelik G, Unal S. Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004). *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(3): 147-54.
113. Gur D, Hascelik G, Aydin N, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21(4): 383-9.

114. Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A: İdrarda üreyen *Escherichia coli* 'lerin geniş spektrumlu beta laktamaz yönünden irdelenmesi. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2006; 13(4): 249-52.
115. Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A, Ay S. Kan Kültürlerinde Üreyen *Escherichia coli* 'lerin Antibiyotik Duyarlılıkları, GSBL Oranları ve Hastane Birimlerine Göre Dağılımı. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2006; 13(3): 147-50.
116. Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. Fırat Tıp Dergisi 2010; 15(4): 197-200.
117. Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T ve ark. Beş Yılda İzole Edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. Suşunda Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Üretiminin Yıllara, Kliniklere ve Örnek Türlerine Dağılımı. Ankem Derg 2010; 24(1): 34-41.
118. Peña C, Gudiol C, Tubau F, et al. Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients. Clin Microbiol Infect 2006; 12(3): 279-84.
119. Pfaller MA, Jones RN and the MYSTIC Study Group (Americas): MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections, J Antimicrob Chemother 2000; 46(T2): 25-37.
120. Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad spectrum agents against nosocomial isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 63(2): 217-22.
121. Borg MA, Scicluna E, de Kraker M, et al. Antibiotic resistance in the southeastern Mediterranean--preliminary results from the ARMED project. Euro Surveill 2006; 11(7): 164-7.
122. Gudiol C, Calatayud L, Garcia-Vidal C, et al. Bacteraemia due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 333-41.
123. Kuster SP, Hasse B, Huebner V, et al. Risk factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care university hospital in Switzerland. Infection 2010; 38: 33–40.

124. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. Indian J Med Res 2009; 129(6): 695-700.
125. Sasaki T, Hirai I, Niki M, et al. High prevalence of CTX-M beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 666–8.
126. Tian SF, Chen BY, Chu YZ, Wang S. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. Can J Microbiol 2008; 54: 781–5.
127. Vinue´ L, Sa´enz Y, Marti´nez S, et al. Prevalence and diversity of extended spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 954–7.
128. Rodri´guez-Ban˜o J, Lo´pez-Cerero L, Navarro MD, et al. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1142–9.
129. Guimaraes B, Barreto A, Radhouani H, et al. Genetic detection of extended spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates and vancomycin- resistant enterococci in fecal samples of healthy children. Microb Drug Resist 2009; 15: 211–6.
130. Kim YK, Pai H, Lee HJ, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(5):1481-91.
131. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(8): 2720-5.
132. Rooney PJ, O’Leary MC, Loughrey AC, et al. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 635–41.
133. March A, Aschbacher R, Dhanji H, et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect 2010; 16(7): 934-44.
134. Coque TM, Baquero F, Canto’n R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Euro Surveill 2008; 13(pii):19044.

135. Heffron F, Sublett R, Hedges RW, Jacob A, Falkow S. Origin of the TEM-beta-lactamase gene found on plasmids. *J Bacteriol* 1975; 122(1): 250-6.
136. Matthew M and Hedges RW. Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J Bacteriol* 1976; 125: 713–8.
137. Novais A, Baquero F, Machado E, et al. International spread persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696: Tn1 and IS5075-Tn-21. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(2): 825-34.
138. Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, et al. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3805-8.
139. Pai H, Lyu S, Lee JH, et al. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1758-63.
140. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* blood stream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3554-60.
141. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, et al. Norwegian ESBL Study Group. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *Clin Microbiol* 2007; 45(1):199-205.
142. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5): 943-9.
143. Machado E, Coque TM, Cantón R, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(6): 1370-4.
144. Taşlı H, Bahar H. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 162-7.

145. Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785–90.
146. Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1881–4.
147. Aktaş Z, Poirel L, Salcioğlu M, et al. PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(3): 193-8.
148. Nordmann P, Ronco E, Naas T, et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5): 962-9.
149. Iabadene H, Dallenne C, Messai Y, et al. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9): 4043-4.
150. Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(10): 2265-9.
151. Kolaylı F, Gacar G, Karadenizli A, et al. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249(2): 241-5.
152. Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52(5): 535-41.
153. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, et al. Multifocal detection of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2523-9.
154. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 622-32.

155. Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysosouli Z, Giamarellou H. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 432–3.
156. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, et al. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo-b-lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum-b-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 474–5.
157. Hoşoğlu S, Gündes S, Kolaylı F, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. Indian J Med Microbiol 2007; 25(4): 346-50.
158. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 56(4): 698-702.
159. Duarte A, Boavida F, Grosso F, et al. Outbreak of GES-1 b-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1481–2.
160. Kim J, Hong SG, Bae IK, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type ST131 carrying both the blaGES-5 and blaCTX-M-15 genes. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2974-5.
161. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, et al. Distribution of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3739–43.
162. Poirel L, Van De Loo M, Mammeri H, Nordmann P. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum beta-lactamase VEB-1. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3091–4.
163. Nazik H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(5): 2146-7.
164. Nazik H, Öngen B, Mete B, et al. Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-Ib-cr genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Istanbul, Turkey. J Int Med Res 2011; 39(5): 1932-40.

165. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, et al. Emergence of PER and VEB extended spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 178–82.
166. Naas T, Coignard B, Carbonne A, et al. VEB-1 extended spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1214–22.
167. Kim JY, Park YJ, Kim SI, et al. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. J Antimicrob Chemother 2004; 54(6): 1144–7.
168. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. Int J Antimicrob Agents 2010; 3: 316–21.
169. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH: First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 4015–21.
170. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strain A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1241–4.
171. Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 1135–41.
172. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, et al. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3280–4.
173. Hawkey PM: Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1): 159– 65.
174. Haque SF, Ali SZ, Tp M, Khan AU. Prevalence of plasmid mediated *bla*(TEM-1) and *bla*(CTX-M-15) type extended spectrum beta-lactamases in patients with sepsis. Asian Pac J Trop Med 2012; 5(2): 98–102.
175. Gür D, Gülay Z, Akan OA, ve ark. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4):537–44.

176. Nazik H, Öngen B, Sarıkaya A, Kuvat N, İlktaç M. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Ko-rezistansı. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4):537-44.
177. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. J Clin Microbiol 2008; 46(3): 1110-2.
178. Öksüz L, Gürler N. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazların Tiplendirilmesi ve Plazmid Profil Analizi. Mikrobiyol Bul 2009; 43: 183-194.
179. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Detection of bla(CTX-M) beta-lactamase genes in extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacteria. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 187-96.
180. Mammeri H, Nordmann P, Berkani A, Eb F. Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) beta-lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 2008; 282(2): 238-40.
181. Andrasevic AT, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-negative pathogens isolated from blood in Europe (2004-2009). Int J Antimicrob Agents 2012; 39(2): 115-23.
182. Kiremitci A, Dinleyici EC, Erben N, et al. In vitro activity of ertapenem and other carbapenems against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care center in Turkey. Expert Opin Pharmacother 2008; 9(9):1441-9.
183. Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Investigation of the susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains to ertapenem and other carbapenems. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1):28-35.
184. Poirel L, Villa L, Bertini A, et al. Expanded-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. Emerg Infect Dis 2007; 13: 803-4.
185. Tunçcan ÖG, Keten DT, Dizbay M, Hızal K. Hastane Kaynaklı *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Suşlarının Ertapenem ve Diğer Antibiyotiklere Duyarlılığı. ANKEM Derg 2008; 22(4): 188-92.
186. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 463–9.

187. Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, et al. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 291-5.
188. Al-muhtaseb M, Kaygusuz A. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Sıklığı. *Ankem Derg* 2008; 22(4): 175-82.
189. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, et al. In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 215–27.
190. Görgeç S, Kuzucu Ç, Yetkin F, Ersoy Y. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten Gram Negatif Bakterilerde Tigesiklin ve Diğer Antimikrobiyallerin İn vitro Etkinliği ve Karbapenemaz Aktivitesinin Araştırılması. *Journal of Inonu University Medical Faculty* 2011; 18(2): 106-10.
191. Yu WL, Pfaller MA, Winokur PL, Jones RN. Cefepime MIC as a predictor of the extended-spectrum beta lactamase type in *Klebsiella pneumoniae*, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(5): 522-4.
192. Song W, Park MJ, Kim HS, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints for β -Lactams in *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases and/or Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases. *Korean J Clin Microbiol* 2011; 14(1): 24-29.
193. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 16;6: 130.
194. Canto' n R, Coque TM, Baquero F: Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 315-25.
195. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 273-8.
196. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 1946-55.

197. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother 2008; 62(2): 284-8.
198. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. J Antimicrob Chemother 2008; 62(6): 1241-4.