

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *K. PNEUMONIAE*
SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ
ENZİM VARLIĞININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ebru YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2009
ANKARA**

Ebru YILMAZ tarafından hazırlanan “KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *K. PNEUMONIAE* SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ENZİM VARLIĞININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Güven URAZ
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim SULTAN
Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Güven URAZ
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Prof. Dr. Nevin KESKİN
Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Prof. Dr. M. Yakup ARICA
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 10/07/2009

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nail Ünsal
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ebru YILMAZ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *K. PNEUMONIAE* SUŞLARINDA
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ENZİM VARLIĞININ
PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)**

Ebru YILMAZ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2009**

ÖZET

Geniş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) gram-negatif basillerde sefalosporinlere (seftazidim, seftriakson, sefotaksim) ve aztreonama dirençten sorumludurlar. Geniş spektrumlu beta laktamaz üreten *Klebsiella* bakterileri klinisyenler açısından büyük bir problemdir. Bu enzimler, özellikle çocuk hastalar ile tıbbi ve cerrahi birimlerde tedavide başarısızlık nedenidir. Araştırmada geniş spektrumlu beta laktamaz varlığı fenotipik (çift disk sinerji testi ve klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemi) ve genotipik metodlarla (PZR-RFLP) araştırılmıştır. Ayrıca *Klebsiella* bakterilerinde plazmid analizi çalışılmıştır.

Araştırmada çeşitli klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından 128 *Klebsiella* bakterisi toplanmıştır. Bu bakteriler manuel yöntemlerle ve API 20E test kiti ile adlandırılmıştır. İdentifikasyon sonucu 103 *K.pneumoniae* (86 idrar kültürü, 7 yara kültürü, 5 kan kültürü, 3 balgam kültürü, 2 trakeal aspirat kültürü, 2 aspirasyon sıvısı kültürü), 25 *K.oxytoca* (21 idrar kültürü, 2 yara kültürü, 1 trakeal aspirat kültürü, 1 aspirasyon sıvısı kültürü) elde edilmiştir. Çift disk sinerji testi (ÇDST) ile %66 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir. Klavulonik asit kombinasyonu içeren

disklerin kullanımı yöntemiyle *Klebsiella* şuşlarının %59,37'sinin GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada; *Klebsiella* bakterilerinde SHV ve TEM tipi GSBL, spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemiyle belirlenmiştir. SHV tip GSBL izolatların %56,25'inde (128 izolatın 72'sinde), TEM tip GSBL ise izolatların sadece %39,84'ünde (128 izolatın 51'inde) bulunmuştur. Amplifikasyon sonucu sırasıyla 293bp ve 966bp'lik ürünler elde edilmiştir. Bunun yanı sıra SHV ve TEM spesifik PZR ürünlerinin RFLP analizi de çalışılmıştır. Kesim sonucu, PZR ürünlerinin hiçbirinin *NheI* restriksiyon enzimiyle kesilmediği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada *Klebsiella* bakterilerinin plazmid DNA profilleri belirlenmiş ve molekül ağırlıkları tespit edilmiştir. Sonuçlar 42 izolatın plazmid taşıdığını ve molekül ağırlıklarının 1,375 ile >21,226 kb arasında bulunduğunu göstermiştir. Diğer izolatların plazmid DNA taşımadığı belirlenmiştir. Plazmid DNA bulunan 42 izolatın 32'sinde ÇDST yöntemi veya PZR çalışmasında GSBL taşıdığı belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.010
Anahtar Kelimeler : *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz, PCR-RFLP.
Sayfa Adedi : 107
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Güven URAZ

**INVESTIGATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE
ENZYME WITH PCR-RFLP IN *K. PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED
FROM CLINICAL SAMPLES
(Ph. D. Thesis)**

Ebru YILMAZ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
July 2009**

ABSTRACT

Extended-spectrum beta lactamases (ESBLs) are responsible for resistance to cephalosporins (ceftazidime, ceftriaxone, and cefotaxime) and aztreonam in gram-negative bacilli. Extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella* bacteria are a major problem for clinicians. These enzymes increase are cause of failure in treatment particularly paediatric patients and also in medical and surgical units. In the research ESBL was investigated by phenotypical (Double disc synergy test, Clavulonic acide combination) and genotypical methods (PCR-RFLP). Plasmid analysis of *Klebsiella* isolates were also studied in this research.

In the research, one hundred twenty eight *Klebsiella* bacteria were collected from different microbiology laboratories in Ankara. These bacteria were identified with classical methods and API 20E. According to the results of identification, 103 *K. pneumoniae* (86 urine culture, 7 lesion culture, 5 blood culture, 3 sputum culture, 2 endotracheal aspirates culture, 2 aspirate fluid culture) and 25 *K. oxytoca* (21 urine culture, 2 lesion culture, 1 endotracheal aspirates culture, 1 aspirate

fluid culture) were obtained. ESBL has been detected %66 in *Klebsiella* bacteria by DDST. It has been detected 59,37% in *Klebsiella* bacteria by disc method including Clavulonic acide combination.

In the present study, SHV and TEM type ESBL was determined in *Klebsiella* isolates by PCR method using spesific primers. SHV type ESBL was found in 56,25% (72 of 128) of isolates and TEM type ESBL were only found in 39,84% (51 of 128) of isolates. Amplications of the expected size about 293bp and 966bp were observed, respectively. On the other hand; RFLP analysis of SHV and TEM specific PCR products were also studied. Result of the digestion showed that, any of the PCR products were digested by *NheI* restriction enzyme. Moreover; Plasmid DNA profiles of *Klebsiella* bacteria were determined and their molecular weights were found. The results indicated that fourty two isolates were carried plasmids and their molecular weights were ranged from 1,375 to >21,226 kb. It was also determined that other isolates were not carried any plasmid DNA. It was also determined that ESBL was detected in 32 of the 42 isolates that are carried plasmid DNA by PCR method or DDST.

Science Code : 203.1.010

Key Words : *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, Extended spectrum beta lactamase, PCR-RFLP.

Page Number : 107

Adviser : Prof. Dr. Güven URAZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Güven URAZ'a; tez izleme komitesinde yer alan hocalarımdan Prof. Dr. Leyla AÇIK'a tezimin yönlendirilmesinde ve laboratuvar çalışmalarında ki katkısından dolayı teşekkür ediyorum. Yine tez izleme komitemde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Nevin Keskin'e tezimin yönlendirilmesinde yaptığı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca doktora çalışmam boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Serkan YILMAZ'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2007-36 No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Beta Laktam Antibiyotikler	4
2.1.1. Penisilinler	5
2.1.2.Sefalosporinler	7
2.1.3. Monobaktamlar.....	8
2.1.4. Karbepenemler.....	9
2.1.5. Beta laktamaz inhibitörleri	10
2.2. Beta laktamazlar	10
2.2.1.Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL).....	16
2.3. Genus <i>Klebsiella</i>	23
2.3.1. Biyokimyasal özellikleri.....	24
2.3.2. Antijen yapıları	25

	Sayfa
2.3.3. Virölans faktörleri.....	25
2.3.4. Etken oldukları klinik tablolar	26
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Örnek Toplama.....	28
3.2. Örneklerin Seçilmesi.....	28
3.3. İdentifikasyon.....	28
3.4. GSBL enziminin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi	33
3.4.1. Çift Disk Sinerji Testi	33
3.4.2. Klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı.....	34
3.5. GSBL enziminin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler (PZR-RFLP).....	34
3.5.1. Kromozomal DNA izolasyonu.....	34
3.5.2. Çalışmada kullanılan primerler	35
3.5.3. PZR ile GSBL genlerinin analizi ve GSBL tiplerinin belirlenmesi.....	35
3.5.4. Agaroz Jel Elektroforezi	35
3.5.5. Gram-negatif bakterilerden plazmid DNA izolasyonu	37
3.5.6. Plazmid DNA için agoroz jel elektroforezi.....	37
3.5.7. Plazmid DNA büyüklüklerinin hesaplanması	38
3.5.8. Amplifikasyon ürünlerinin kesimi için kullanılan restriksiyon enzimi	40
3.5.9. PZR ürünlerinin <i>NheI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi	40
3.6. İstatistiksel analiz.....	40
3.7. Kullanılan besiyerleri ve ayıraçlar	41

	Sayfa
3.7.1. EMB(Eosin Methylene Blue) agar	41
3.7.2. TSI(Üç şekerli demirli besiyeri).....	41
3.7.3. İndol besiyeri ve kovac's ayırıcı.....	42
3.7.4. Methyl Red/Voges Proskauer (MR/VP) besiyeri ve ayırıcıları	42
3.7.5. Simmon's Citrate Agar	43
3.7.6. Urea Agar base	44
3.7.7. Motility Indole Ornithine (Mio).....	44
3.7.8. Mueller Hinton Agar.....	45
3.7.9. Difco™ Lysine decarboxylase broth	45
3.7.10. Luria bertani sıvı (LB) besiyeri.....	46
3.7.11. Nutrient Agar(NA).....	46
4. BULGULAR.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	101

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Beta laktamazların sınıflandırılması	16
Çizelge 3.1. Klebsiella türleri için IMVIC test sonuçları	29
Çizelge 3.2. <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> bakterilerin Mio besiyerindeki reaksiyonları	29
Çizelge 3.3. API 20 E (bio-Merieux) test sisteminde yer alan biyokimyasal testler ve test sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	31
Çizelge 3.4. API 20 E (bio-Merieux) test sisteminde kullanılan ayıraçlar .	32
Çizelge 3.5. Çift disk sinerji testinde kullanılan antibiyotiklerin NCCLS kriterlerindeki zon çapları	33
Çizelge 3.6. GSBL tiplerinin belirlenmesi için seçilen primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri	35
Çizelge 4.1. 128 Hasta materyalinin <i>Klebsiella</i> türlerine göre dağılımı..	47
Çizelge 4.2. Çift disk sinerji yöntemine göre GSBL üreten <i>Klebsiella</i> bakterisinin dağılımı	49
Çizelge 4.3. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları	51
Çizelge 4.4. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL üreten <i>Klebsiella</i> bakterileri.....	55
Çizelge 4.5. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları	57
Çizelge 4.6. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı ve ÇDST'ine göre GSBL üreten <i>Klebsiella</i> bakterilerinin karşılaştırılması	62
Çizelge 4.7. PZR çalışması sonucu SHV ve TEM tip GSBL taşıyan <i>Klebsiella</i> bakterileri.....	64

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. 103 <i>K. pneumoniae</i> ve 25 <i>K. oxytoca</i> bakterisinin TEM SHV ve ÇDST sonuçlarının karşılaştırılması.....	67
Çizelge 4.9. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinde farklı yöntemlerle (seçilen primerlerle ve ÇDST) tespit edilen GSBL varlığı.....	68
Çizelge 4.10. Plazmid DNA içeren <i>Klebsiella</i> bakterilerinin dağılımı.....	74
Çizelge 4.11. <i>Klebsiella</i> bakterilerinin plazmid DNA profilleri	75
Çizelge 4.12. 128 <i>Klebsiella</i> bakterilerinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve ÇDST) ve Plazmid varlığı	76

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. ÇDST ile GSBL pozitif <i>Klebsiella</i> bakterisinin görünümü.....	51
Resim 4.2. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemi ile GSBL pozitif <i>Klebsiella</i> bakterisinin görünümü.....	57
Resim 4.3. SHV sentetik oligonükleotit primeri ile çoğaltılan <i>Klebsiella</i> bakterilerinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	72
Resim 4.4. TEM sentetik oligonükleotit primeri ile çoğaltılan <i>Klebsiella</i> bakterilerinin PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	73
Resim 4.5. <i>Klebsiella</i> bakterilerinin plazmid DNA profilleri.....	80
Resim 4.6. <i>Klebsiella</i> bakterilerinin plazmid DNA profilleri.....	81
Resim 4.7. <i>Klebsiella</i> bakterilerinin plazmid DNA profilleri.....	82
Resim 4.8. PZR da çoğaltılan ürünlerin <i>NheI</i> restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları.....	83
Resim 4.9. PZR da çoğaltılan ürünlerin <i>NheI</i> restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları.....	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Penisilinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.2. Sefalosporinlerin kimyasal yapısı	7
Şekil 3.1. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>K. oxytoca</i> türlerinin isimlendirilmesinde kullanılan biyoşimik testler	30
Şekil 4.1. 128 hasta materyalinin <i>Klebsiella</i> türlerine göre dağılımı	48
Şekil 4.2. 103 <i>K.pneumoniae</i> bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı	48
Şekil 4.3. 103 <i>K.oxytoca</i> bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı	48
Şekil 4.4. Çift disk sinerji tasti ile GSBL üreten <i>Klebsiella</i> bakterilerinin % dağılımı	49
Şekil 4.5. ÇDST ile GSBL üreten <i>K. pneumoniae</i> bakterilerinin % dağılımı	50
Şekil 4.6. ÇDST ile GSBL üreten <i>K. oxytoca</i> bakterilerinin dağılımı.....	50
Şekil 4.7. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemine göre GSBL üreten <i>Klebsiella</i> bakterilerinin % dağılımı	56
Şekil 4.8. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemi ile GSBL üreten <i>K. pneumoniae</i> bakterilerinin % dağılımı	56
Şekil 4.9. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemi ile GSBL üreten <i>K. oxytoca</i> bakterilerinin dağılımı	56
Şekil 4.10. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinde Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemi ve ÇDST ile belirlenen GSBL yüzdelerinin karşılaştırılması	62
Şekil 4.11. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı	64

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. 103 <i>K. pneumoniae</i> bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı.....	64
Şekil 4.13. 25 <i>K. oxytoca</i> bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı	65
Şekil 4.14. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı	65
Şekil 4.15. 103 <i>K. pneumoniae</i> bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı.....	66
Şekil 4.16. 25 <i>K. oxytoca</i> bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı	66
Şekil 4.17. 128 <i>Klebsiella</i> bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre % dağılımı	74
Şekil 4.18. 103 <i>K. pneumoniae</i> bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre % dağılımı	74
Şekil 4.19. 25 <i>K. oxytoca</i> bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre % dağılımı	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
g / gr	Gram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
lt	Litre
cfu	Colony forming unit
>	Büyük
Log	Logaritma
kb	Kilobaz
≥	Büyük eşit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
H ₂ S	Hidrojen sülfür
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat

Simgeler**Açıklama****HCl**

Hidrojen Klorür

MgSO₄

Magnezyum Sülfat

Kısaltmalar**Açıklama**

AMC	Amoksisilin/klavulonik asit
API 20E	Analytical Profile Index 20E
ATM	Aztreonam
CAZ	Seftazidim
CPD	Sefpodoksim
CRO	Seftriakson
CTX	Sefotaksim
ÇDST	Çift Disk Sinerji Testi
DDST	Double Disc Sinergy Test
DNase	Deoksiribonükleaz
EMB	Eozin metilen blue
ESBL	Extended Spectrum of Beta Lactamase
GSBL	Geniş spektrumlu beta laktamaz
I	Orta Duyarlı
IRT	İnhibitöre dirençli varyantlar
LCR	Ligase chain reaction- Ligaz zincir reaksiyonu
MHA	Mueller-Hinton Agar
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
MİO	Motility Indole Ornithine
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standarts
OMP	Dış membran proteinleri
PBP	Penisilin bağlayıcı(bağlayan) protein
PCR/PZR	Polymerase chain reaction/ polimer zincir reaksiyonu

Kısaltmalar**Açıklama****PCR-RFLP**

Polymerase chain reaction-
Restriction fragment length
polymorphism

PCR-SSCP

Polymerase chain reaction-
Single strand conformation
polymorphism

R

Dirençli

S

Duyarlı

1. GİRİŞ

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerine mikrobisit veya mikrobiyostatik etki gösteren ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelerdir [Walsh, 2003]. Antibiyotikler sayesinde günümüzde bir çok enfeksiyon hastalığı tedavi edilmektedir. Ancak bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri sayesinde normalde etkili olması gereken birçok antibiyotik tedavide başarısız sonuç verebilmektedir. Dünya’da bilim adamları tarafından yeni antibiyotikler geliştirilirken diğer yandan bakteriler bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren direnç mekanizmaları üretmektedir. Bilinçsiz antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır. Antibiyotiklere karşı geliştirilen direnç mekanizmaları enfeksiyon tedavisinde başarısızlığı arttırmaktadır. Klinikte bu durum ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Bunun dışında herhangi bir antibiyotik tedavisine gerek olmadığı halde bu ilaçlar kullanıldığında da, bakterilerde bu antibiyotiklere karşı direnç gelişebilmektedir.

Dünyada antibiyotik direnci, ilk kez *Escherichia coli* susunda 1940 yılında bildirilmiştir. Takip eden yıllarda antibiyotik kullanımının etkileri görülmeye başlanmıştır. 1959 yılında Japonya’da *Shigella dysenteriae* suşlarında çoklu (multiple) antibiyotik direnci saptanmış ve direnç özelliği konjugasyon ile *Escherichia coli* suşlarına aktarılabilmektedir. 1960’ların sonu ile 1970’li yıllar arasında önce *Staphylococcus aureus* sonra da hastane salgınlarından soyutlanan gram-negatif basil türlerinde ilaç direnci saptanmıştır. Direnç sorunundaki artışa paralel olarak ilaç endüstrisi de geliştiği için tüm ajanlara dirençli mikroorganizmalar çıkmadan, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler (1980) ve florokinolonlar (1990) geliştirilmiş ve enfeksiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak günümüzde bu antibiyotiklere karşı da direnç geliştiği görülmektedir [Ustaçelebi ve ark., 1999; Yüce, 2001]. Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmaktadır.

Son yıllarda antibiyotiklere karşı artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit etmektedir. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta laktamaz enzim üretimi, birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır [Akçam ve ark., 2004]. Bunların yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (GSBL) [Bradford, 2001; Bush, 2001]. GSBL'ler gram-negatif basillerde bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir [Stewart ve ark., 2001]. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır [Sanders ve Sanders, 1992]. Son yıllarda klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının Dünya'da ve Türkiye'de değişen oranlarda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ürettiği bildirilmiştir. Kore'de yapılan bir araştırmada 3 hastaneden 53 GSBL üreten *K. pneumoniae* elde edilmiştir [Kim ve ark., 1998]. 1998 yılında yayınlanan bir çalışmada farklı şehirlerde bulunan üç Polonya hastanesinden GSBL pozitif olan 11 *K. pneumoniae* ve 1 *E. coli* izolatı belirlenmiştir [Gniadkowski ve ark., 1998]. Türkiye'de 1994-1996 yılları arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden 67 *K. pneumoniae* suşu izole edilmiş, bu izolatların 10'unda GSBL varlığı saptanmıştır [Akyıldız ve ark., 1998]. Yine Türkiye'de yapılan bir araştırmada çeşitli klinik örneklerden 94 *E. coli* ve 58 *K. pneumoniae* izole edilmiş ve bu izolatlarda GSBL olumluluğu *sırasıyla* %39 ve %66 oranında saptanmıştır [Özkan ve ark., 2002]. Akman tarafından Üniversitemizde 2008 yılında yapılan bir çalışmada 194 *Klebsiella* izolatında GSBL varlığı çift disk sinerji testi yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada ÇDST yöntemiyle %65 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir [Akman, 2008].

Araştırmamızda, farklı hastanelerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen hasta materyalleri toplanarak bu hasta materyalleri spesifik besiyerinde kültüre edildikten sonra *Klebsiella* türlerinin isimlendirmesi yapılmıştır. *Klebsiella* patojenite açısından çok önemli bir *Enterobacteriaceae* üyesidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar *Klebsiella* bakterilerinde GSBL

varlığının her geçen gün artmakta olduğunu göstermiştir. Araştırmada klinik önemi olan *Klebsiella* bakterilerinde GSBL enzim varlığını fenotipik (Çift disksinerji testi ve Klavulonik asit yöntemi) ve genotipik yöntemlerle(PZR-RFLP) belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beta Laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisid olmaları nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mürein) tabakası mikroorganizmanın yapısını ve bütünlüğünü sağlar. Bu tabaka çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu çapraz bağlantı N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanil D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir. Beta laktam antibiyotiklerin temel hedefi bu penisilin bağlayıcı proteinlerdir. Beta-laktam antibiyotiklerin yapısı ve uzaydaki konfigürasyonları D-alanil D-alanin molekülüne çok benzemektedir. Bu benzerlik beta-laktam antibiyotiklerin PBP ile reaksiyona girmelerini ve D-alanil D-alanin molekülünün yerini alarak transpeptidasyonu engellemelerini sağlar [Gür, 2002]. Hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelmektedir [Gür, 1997; Opal ve Medeiros 2005]. Beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için gram-negatif bakterilerde porin (Outer Membran Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir [Samaha-Kfoury ve Araj, 2003]. Gram-pozitif bakterilerde dış membran tabakası bulunmayıp, sitoplazmik kalın bir peptidoglikan tabakası uzanmaktadır. Beta-laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadır [Opal ve Medeiros, 2005].

Beta laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

- 1) Penisilinler
- 2) Sefalosporinler

- 3) Monobaktamlar
- 4) Karbapenemler
- 5) Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam)

2.1.1. Penisilinler

Penisilinlerin temel yapısı, bir tiazolidin halkası, bir betalaktam halkası ve bir yan zincirden oluşmaktadır (6 amino penisilanik asit).

Doğal penisilinler: penisilin G, prokain penisilin G, kristalize penisilin G, benzatin penisilin G, penisilin V (Fenoksi metil penisilin)

Penisilinaza dayanıklı penisilinler: metisilin, nafsilin, izaksazolil penisilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, oksasilin

Aminopenisilinler: ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, siklasilin, episilin, pivampisilin

Pseudomonaslara etkili penisilinler: karbenisilin, indanil karbenisilin (korindasilin), tikarsilin

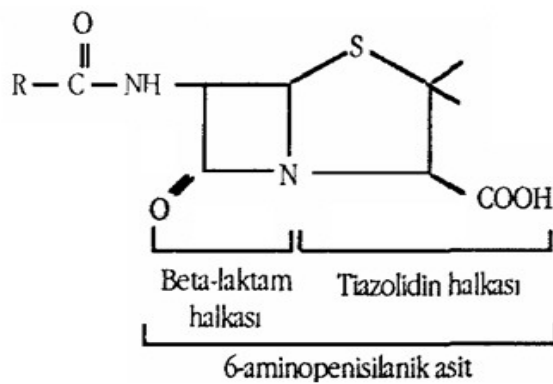
Geniş spektrumlu pseudomonaslara etkili penisilinler: azlosilin, mezlosilin, piperasilin

Amdinopenisilinler: amdinosilin, pivamdinosilin

Beta-laktam inhibitörlü kombine penisilinler: ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat, tikarsilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam

Doğal penisilinler ve penisilinaza dayanıklı penisilinler gram-pozitif bakterilere etkilidirler. Aminopenisilinlerin etki spektrumu Penisilin G'ye benzer ve kendi üyeleri arasında da etkinlik açısından farklılık yoktur. Her ne kadar insan

florasında yer alan çoğu *Escherichia coli*, aminopenisilinlere duyarlı ise de hastane kökenlerinde plazmidlerle yayılan direnç yaygındır. *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi* dahil çoğu Salmonellalar beta-laktamaza bağlı direnç gösterirler. Ayrıca *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* türleri ve *Bacteriodes fragilis*'lerin çoğu penisilinlerin bu sınıfına dirençlidir. Çünkü tüm aminopenisilinler gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin beta-laktamaz enzimlerine duyarlıdır. Bugün için gram-negatif basil infeksiyonlarında aminopenisilinler ampirik olarak seçilmemelidir [Sarı, 2005]. *Pseudomonas*'lara etkili penisilinler, *Pseudomonas aeruginosa*'yı da içine alan pek çok aerob gram-negatif basile etkili olan ilaçlardır. Piperasilin ve azlosilin şu anda *Pseudomonas*'lara en etkili penisilinlerdir. Gram-pozitif bakterilere etkinlikleri, penisilin G ve aminopenisilinlerden daha azdır. Bu grup penisilin türevleri beta-laktamazlara dirençli değildir [Öncül, 2002; Sarı, 2005]. Son yıllarda klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin aynı preparat içinde birleştirilmesi ile beta-laktamaz salgılayan bakterileri de etki spektrumu içine alan beta-laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler geliştirilmiştir. Ancak bu kombine preparatlardaki beta-laktamaz inhibitörleri, tüm beta-laktamazları inhibe edemezler. Bu ilaçlar genellikle *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacteriodes*, *Klebsiella* türleri ve *E. coli*'nin basit beta-laktamazlarını inhibe ederler [Chambers, 2005].



Şekil 2.1. Penisilin kimyasal yapısı [Ustaçelebi ve ark., 1999]

2.1.2. SEFALOSPORİNLER

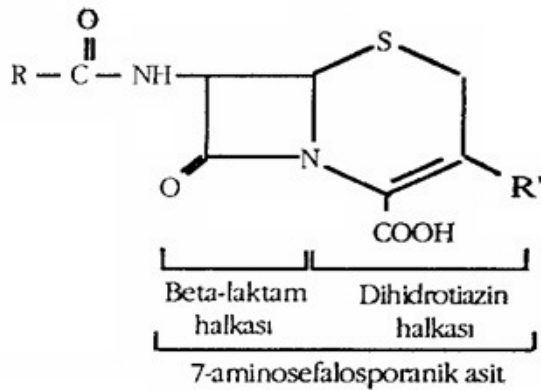
Beta-laktam halkası yanında penisilindeki 5 üyeli tiazolidin halkası yerine sefalosporinlerde 6 üyeli bir dihidrotiazin halkası bulunur. Dihidrotiazin halkasında fazladan bulunan karbon atomu 3. pozisyonda da yeni yan dalların ilavesi ile daha değişik ve çok sayıda sefalosporinler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Kronolojik esasa dayanan ve bakterilere karşı etki spektrumundaki gelişmeyi de yansıtmaları yönünden pratik değeri olan bir sınıflandırma şu şekildedir [Ustaçelebi ve ark., 1999].

1. *kuşak sefalosporinler*: sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefalekssin, sefapirin, sefradin, sefadroksil.

2. *kuşak sefalosporinler*: sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, seforanid, sefaklor, sefmetazol, sefotetan.

3. *kuşak sefalosporinler*: sefotaksim, seftizoksim, sefoperazon, seftriakson, seftazidim.

4. *kuşak sefalosporinler*: sefepim, sefpirom



Şekil 2.2. Sefalosporinlerin kimyasal yapısı [Ustaçelebi ve ark., 1999]

Parenteral uygulanan 1. kuşak sefalosporinlerin etkinlikleri birbirine benzerdir. Yalnızca sefazolinin stafilokoklara etkinliği biraz daha az, gram-negatif etkinliği diğer 1. kuşak üyelerine göre biraz daha fazladır. Birinci kuşak sefalosporinlerden herhangi birisi *in vitro* antibiyotik duyarlılık testinde diğerlerinin yerine kullanılabilir. İkinci kuşak sefalosporinler, 1. kuşağa göre stafilokok ve streptokoklara daha az, gram-negatif basillere ve anaeroblara daha fazla etkilidir. Sefoksitin, gram-negatif basillerin ürettiği bazı beta laktamazlara dirençlidir ve bazı *Enterobacteriaceae*'lar tarafından üretilen beta laktamazların oldukça etkili indükleyicisidir [Sarı, 2005]. Üçüncü kuşak sefalosporinler gram-negatif basillere karşı yaygın olarak kullanılan sefalosporinlerdir. *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, indol (+) *Proteus*, *Providencia* ve *Serratia*'ya karşı etkilidirler. İkinci kuşaktakilerden klinik yönden en önemli farkları, *P. aeruginosa* kökenlerine de etkili olmaları ve diğer gram-negatif basillere ve *Neisseria* türlerine karşı daha güçlü etkinlik göstermeleridir. Gram-pozitif koklara özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı etkileri 1. kuşağa oranla çok zayıftır. Anaeroblara karşı etkileri değişik derecededir. Beyin omurilik sıvısına geçişleri 1. kuşağa göre iyidir [Neu, 1985].

2.1.3. Monobaktamlar

Aztreonam ilk sentetik monobaktam antibiyotiktir. Beta laktam halkasına birleşik bir başka halka içermemelerinden dolayı penisilin ve sefalosporinlerden ayrılırlar. Aztreonam, gram-negatif bakterilerde PBP3'e bağlanarak duvar sentezini bozar. Gram-pozitif bakterilerin PBP'sine bağlanamaz. Anaerob bakterilerin PBP'sine de düşük affinite gösterir. Bu yüzden etki alanı gram-negatif aerob bakteriler ile sınırlıdır. Aztreonam, parenteral uygulamadan sonra dokulara ve vücut sıvılarına çok iyi dağılır. *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* gibi sık rastlanan gram-negatif patojenlere etkilidir [Sarı, 2005].

2.1.4. Karbapenemler

Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktam ajanlardan ayrılır. Karbapenemler *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. Beta-laktamların en geniş spektrumlu grubudur. Karbapenemler çok geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye ve klinikte gözlenen birçok beta-laktamaza karşı stabiliteye sahiptir. GSBL ve AmpC enzimini fazla miktarda üreten gram-negatif bakterilere karşı etkinliklerini korurlar [Livermore ve Woodford, 2000]. Ancak sınıf B metallo-beta-laktamazlar dahil karbapenemazlar, bu antibiyotikleri hidroliz edebilmektedir. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır infeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça önemli bir yere sahiptir [Bonfinglio ve ark., 2002]. Bu grupta İmipenem ve Meropenem bulunmaktadır. İmipenemin böbrekte enzimatik yıkıma uğraması ve metabolitinin nefrotoksik olmasından dolayı tek başına kullanılamaz. Bir dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1/1 oranında birleştirilerek pazarlanmaktadır. Silastatin sodyum, DHP-1'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür. Silastatinin antibakteriyel etkinliği ya da beta-laktamazlar üzerine etkisi yoktur. İmipenemin etkisini antagonize etmez [Endtz ve ark., 1997]. Meropenem ise imipenemin aksine insan böbrek dehidropeptidaz I (DHP-1) enzimine karşı çok yüksek stabilite gösteren bir karbapenemdir. Klinik olarak önemli olan hemen tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. PBP2, hem imipenemin hem de meropenemin başlıca hedefidir. Ancak meropenem, *P. aeruginosa* PBP2 ve 3'üne daha büyük bir afinite gösterir [Sarı, 2005]. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve gram-negatif bakterilerdeki karbapenemazlar hariç diğer tüm beta-laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden imipenem, gram-pozitif organizmalara karşı daha etkili gözükürken meropenem, gram-negatiflere özellikle de *P. aeruginosa*'ya daha etkilidir [Edwards, 1995; White ve ark., 1996].

2.1.5. Beta Laktamaz İnhibitörleri

Beta-laktamaz inhibitörleri, beta-laktam halkası taşımalarıyla beta-laktam antibiyotiklere çok benzeyen, ancak tek başına kullanıldıklarında antibakteriyel etkinlikleri olmayan veya az olan maddelerdir. Klinik kullanımda olan üç tane beta-laktamaz inhibitörü vardır. Bunlar klavulonik asit (klavulanat), sulbaktam ve tazobaktamdır. Klavulanatın zayıf antibakteriyel etkisi vardır. Stafilokokların yanı sıra, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* gibi gram-negatif bakterilerin plazmid kaynaklı beta laktamazlara ve *Bacillus fragilis* başta olmak üzere tüm anaerob bakterilerin enzimlerine karşı etkilidir. Ancak *Enterobacter* ve *Pseudomonas* gibi bakterilerdeki indüklenabilen beta laktamazlara karşı etkisizdir. Penisilin ve sefalosporinlerle sinerjistik etkilidir. Sulbaktam da, Klavulonik asit gibi etkinlik gösterir. Yine penisilin ve sefalosporinlerle sinerjistik etkilidir. Tazobaktam ise başta *Bacteroides fragilis* olmak üzere anaerob bakterilerdeki beta laktamazlara karşı en etkili inhibitördür. Amoksisilin ve tikarsilin klavulanatla; ampisilin sulbaktamla ve piperasilin de tazobaktamla kombine edilerek bu antibiyotiklerin beta-laktamazlardan etkilenmesi önlenmiştir.

2.2. Beta Laktamazlar

1975'te Spratt beta laktam antibiyotiklerin hedef molekülünün penisilin bağlayan proteinler (PBP) olduğunu tanımladı. PBP'ler peptidoglikan sentezinde görev yapan çeşitli enzimlerdir ve transpeptidaz, karboksipeptidaz veya glikozil transferaz yapısında olabilirler. Beta laktam antibiyotikler kovalan bağlarla bu moleküllere bağlanırlar, peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve böylece bakteri üremesini engeller [Leung Kei 2002; Jehl ve ark., 2003].

Beta laktamazlar ise antibiyotik hedef bölgesine ulaşmadan, beta laktam halkasında bulunan, beta laktam halkasını hidrolize ederek antibiyotiği etkisiz

hale getirirler [Jehl ve ark., 2003; Samaha-Kfoury ve Araj, 2003]. Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağlarını parçalarlar. Substratları olan antibiyotik ile karşılıklı etkileşerek kompleks bir ara ürün oluşturular. Daha sonra bu kompleks su ile hidrolize olur. Aktif enzim tekrar serbestleşir ve yeni beta laktam molekülleriyle etkileşime girer. Açığa çıkan beta laktam antibiyotiklerin asidik türevleri etkisiz hale gelir ve antibakteriyel özelliklerini kaybederler [Bush ve ark., 1995; Yorgancıgil, 1999; Leung Kei, 2002].

Bugüne kadar en az 350 ye yakın β -laktamaz enzimi tanımlanmıştır. 1980'de Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır:

Sınıf A, öncelikle penisilinleri hidrolize eder.

Sınıf B, karbapenemazlardan oluşan metallo- β -laktamazlardır.

Sınıf C, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan enzimlerdir.

Sınıf D, oksasilinazlardan oluşur.

1995 yılında Bush, Jacoby ve Mederios, biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta laktamazları 4 gruba ayırmışlardır (Çizelge 2.1). Günümüzde en geçerli kabul edilen ve en sık kullanılan sınıflama budur [Bush ve ark., 1995].

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

Ancak sentez miktarı açısından farklılıklar göstererek yüksek veya düşük düzeyde üretilebilir. *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Shigella spp.*'de ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır. Buna karşın *E. coli* izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir [Livermore, 1995]. *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morgenella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Providencia rettgeri*'deki sentezlenen kromozomal beta-laktamazlar indüklenebilen türdendir [Livermore, 1995; Gür, 1997]. Normalde bakteri tarafından bu enzimler bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir [Livermore, 1995]. Farklı beta-laktam antibiyotikler değişik oranlarda olmak üzere Grup 1 beta-laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici beta-laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski bazal beta-laktamaz sentezine geri döner. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir direnç söz konusu olmaz. Esas sorun bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen mutant suşlar nedeniyle oluşur. İndüklenebilir kromozomal beta-laktamaz taşıyan bu gram-negatif bakterilerde normalde 10^{-5} - 10^{-7} arasında bir sıklıkla baskılanmış mutantlar bulunur. Bu baskılanmış mutantlarda beta-laktamaz enzimlerinin sentezi devamlı ve yüksek düzeyde olmaktadır. Böyle bakterilerle oluşan infeksiyonların bir indükleyici antibiyotik ile tedavisi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması, antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalması ile tedavi başarısızlıkları olabilmektedir. Bunun yanı sıra dirençli bakterilerin hastane mikroflorasına yerleşmesine bağlı olarak da hastane infeksiyonu epidemileri ortaya çıkabilmektedir [Livermore, 1995; Gür, 1997].

Grup 2: En geniş kategoriye oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Tümü moleküler sınıf olarak A ve D'de yer almaktadır. Bu beta-laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz

etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar [Medeiros, 1997]. 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan TEM ve SHV grubu enzimler, sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar [Livermore, 1995; Gür, 1997; Yuluğ, 1997].

2a: Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulonik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır. *Staphylococcus aureus*'un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *Bacillus cereus*'un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır [Bush ve ark., 1995].

2b: Hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden, klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta-laktamazları içerirler [Gür, 1997]. Geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları Enterobacteriaceae ailesinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca OHIO-1 ve *Haemophilus influenzae*'da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedir. TEM-1 beta laktamazı özellikle *E. coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K. pneumoniae* suşlarında bulunur [Yuluğ, 1997; Livermore, 1998].

2be: Oksiimino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM- ve SHV- enzimleri gelişmiştir [Yuluğ, 1997]. Bunlar grup 2be'de yer almakta ve genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulonik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine

duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye’den izole edilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır [Danel ve ark., 1995; Vahaboğlu ve ark., 1995].

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

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

2d: Bu grup, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye’de izole edilen bir suşda saptanmıştır [Hall ve ark., 1993]. Klavulonik asit ve sulbaktama dirençlidirler. Grup 2’nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A’da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D’de yer alır.

2e: Bu grupta yer alan beta-laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1’dekilerden farklı olarak klavulonik asitle inhibe olmaktadır. *Bacillus fragilis*’in CepA enzimi, *Bacteroides uniformis* ve *Bacillus vulgatus*’un kromozomal CblA ve CfxA, *E. coli*’den izole edilen FEC-1 ile *Stenotrophomonas maltophilia*’nın L2 ve *Yersinia enterocolitica*’dan izole edilen Blal enzimleri bu grupta yer almaktadır [Bush ve ark., 1995].

2f: Bu grupta, *Enterobacter cloacae*’nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*’nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens*’in Sme-1 enzimi yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulonik asit ile inhibe olmaktadır [Bush ve ark., 1995].

Grup 3 metallo- β -laktamazlar: B sınıfı olan bu beta laktamazlar, monobaktamlar hariç tüm beta laktamları ve karbapenemleri hidrolize ederler. Sıklıkla etki spektrumlarını genişletecek bir diğer enzimle birlikte üretilirler. Diğer enzimlerden farklı olarak aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunur. Beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler fakat EDTA ile inaktive olurlar. 3 alt gruba bölünmüştür. 3a'da genellikle penisilinleri karbapenemlerden daha hızlı hidrolize eden IMP-1-8 ve VIM-1-3 enzimleri yer alır. 3b'de *Aeromonas*'ın gerçek karbapenemazları, 3c'de sadece *Legionella gormanii*'nin yüksek sefalosporinaz aktivitesi olan metalloenzimleri yer alır.

Grup 4: Bu grup, klavulonik asit ile pek de iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan oluşur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. Yapıları henüz tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus fragilis*, *Campylobacter jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta-laktamazı bu gruba sokulmuştur. *Pseudomonas cepacia*'daki beta-laktamazlar da bu gruba dahildir. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir [Gür, 1996].

Çizelge 2.1. Beta laktamazların sınıflandırılması

Bush Jacoby Medeiros	Ambler	Tercih Edilen Substrat	Klavulonik Asit Reaksiyonu	Özellikler
1	C	Sefalosporinler	-	Gram negatif bakterilerde bulunan çoğunlukla kromozomal, bazen plazmid kaynaklı Amp-C enzimleri
2a	A	Penisilinler	+	Stafilokok ve enterokoklara ait penisilinazlar
2b	A	Sefalosporinler Penisilinler	+	Gram negatif bakterilerde bulunan geniş spektrumlu beta laktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler Sefalosporinler Monobaktamlar	+	GSBL : TEM-3, TEM-26, SHV-2, SHV-6 <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Penisilinler	+/-	İnhibitöre dirençli TEM beta laktamazlar: TEM-30, TEM-36
2c	A	Penisilinler Karbenisilin	+	Karbenisilini hidrolize eden enzimler PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler Kloksasilin	+/-	Kloksasilini hidrolize eden enzimler OXA-1, OXA-11
2e	A	Sefalosporinler	+	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	+	Karbapenemleri hidrolize eden enzimler <i>Serratia marcescens</i> , Sme-1
3	B	Bir çok beta laktam Karbapenemler	-	Monobaktamlar dışındaki beta laktamazları hidrolize eden metallo beta laktamazlar: <i>S. maltophilia</i> , L-1
4	Belirlenmemiş	Penisilinler	-	Diğer gruplara dahil edilmeyen beta laktamazlar: <i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı

2.2.1 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL)

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, oksimino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulonik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadırlar [Bradford, 2001]. GSBL'ler oksimino sefalosporinler ve aztreonamın yanısıra birinci kuşak sefalosporinleri ve geniş spektrumlu olanlar dahil penisilinleri de hidrolize uğratırlar. Ancak bu enzimlerin

sefamisin grubu sefalosporinlere (sefoksitin ve sefotetan) karşı etkisi yoktur. Sefamisinlere etkili olmamaları, GSBL'leri AmpC tipi beta laktamazlardan ayıran önemli karakteristik özellikleridir [Bradford, 2001; Rupp ve Fey, 2003; Akova, 2004]. Ancak yine de istisnai durumların söz konusu olabileceği unutulmamalıdır. Örneğin TEM-52'nin moksalaktam ve sefotetanı hidrolize edebildiği gösterilmiştir [Poyart ve ark., 1998]. GSBL'lerin büyük çoğunluğu, özellikle de TEM ve SHV kökenli olanlar, plazmidler tarafından sentez edilmekle birlikte, kromozomlar aracılığıyla sentezlenen veya integron kökenli çok sayıda GSBL de mevcuttur. Şimdiye dek tanımlanan GSBL'lerin sayısı 200'ü aşmış durumdadır [Gülay, 2001; Akova, 2004; Gür, 2004].

Günümüzde tüm beta laktamazlar içinde sayıları en hızla artan beta laktamaz gruplarının başında GSBL'ler gelmektedir [Bonomo ve ark., 1997]. Yapısal özellikler ve evölüsyon açısından GSBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadırlar [Gniadkowski, 2001; Weldhagen ve ark., 2003; Akova, 2004]. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES, ve OXA'dır. GSBL'lerin büyük çoğunluğu aktif bölgesinde bir serin molekülü içerir ve Ambler'in moleküler sınıflamasına göre A sınıfında yer alır [Ambler, 1980]. OXA grubu enzimler ise D moleküler sınıfında yer almaktadırlar. Beta laktamazların biyokimyasal özelliklerinin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby Medeiros sınıflamasına göre ise GSBL'ler 2be, 2e ve 2d alt gruplarına sokulmaktadır [Ambler, 1980; Bush ve ark., 1995; Gür, 2004]. Grup 2b' de yer alan ve penisilin türevleri ile dar spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları için bu şekilde adlandırılmaktadırlar. GSBL'ler klavulonik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. GSBL'ler sefamisin ve karbapenemleri etkilememektedirler [Ambler, 1980; Gülay, 2001; Akova, 2004; Gür, 2004].

Ancak son yıllarda GSBL kategorisinde değerlendirilen bazı enzimlerin tam olarak bu tanıma uymadıkları gözlenmektedir. Çoğu GSBL, enterik gram-negatif bakterilerin klasik plazmid kökenli beta laktamazları olan TEM-1,

TEM-2 ve SHV-1'den köken alır. Köken alınan ana enzimin aktif bölgesinin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün bazı araştırmacılara göre 7 aminoasidin yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL'ler oluşur [Gülay, 2001; Livermore, 1998; Akova, 2004; Gür, 2004]. Enzimin yapısında meydana gelen bu değişiklik ile enzimin aktif bölgesi genişlemekte ve oksiimino yan zinciri taşıyan beta laktam antibiyotikleri bu enzimlerin substratı haline getirmektedir. Böylece enzim-substrat ilişkisinin sağlandığı aktif bölgede yeni bir modellenme oluşmakta ve geniş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim) ve aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesi sağlanmaktadır. Yani enzimi kodlayan gen yapısında oluşan değişime bağlı olarak peptid yapısında bazı aminoasit değişiklikleri meydana gelmesi GSBL'lere farklı substrat özgülüğü sağlamaktadır. Bu enzimler çoğunlukla bakteri suşları ve türleri arasında yayılabilen büyük plazmidlerde kodlanmaktadır [Gülay, 2001; Gür, 2004].

GSBL' ler başta *K. pneumoniae* olmak üzere, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Burkholderia cepacia* gibi birçok gram-negatif bakteride bulunabilmektedir [Bradford, 2001; Gülay, 2001; Gür, 2004].

TEM Grubu GSBL'ler

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir [Bradford, 2001; Sturenburg ve Mack, 2003]. TEM-1 gram-negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. Plazmid kökenli olarak bilinen eski enzimdir. TEM-1 ve onun kimyasal benzeri TEM-2 enzimleri dar spektrumlu enzimlerdir; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilir ancak oksiimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur [Gür, 2004]. GSBL fenotipi oluşturma yönünden bazı aminoasit değişiklikleri daha

önemlidir; 104. pozisyonda glutamat yerine lizin, 164. pozisyonda arjinin yerine serin veya histidin, 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesi gibi [Gür, 2005]. 12 farklı pozisyonda oluşan aminoasit değişiklikleri günümüzde 100'ün üzerinde TEM kökenli GSBL'nin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu enzimlerin bir kısmı 'inhibitör dirençli TEM (IRT)' türünde enzimler olup, geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmedikleri için gerçek anlamda GSBL olarak kabul edilmezler [Bradford, 2001]. Bu son sayılan enzimler adlarından da anlaşılacağı üzere, klasik GSBL'lerin aksine beta laktamaz inhibitörlerinin etkilerine (özellikle sulbaktam ve klavulanat) karşı dirençlidirler. Ancak, tazobaktam bu enzimleri inhibe edebilmektedir [Bonomo ve ark., 1997; Chaibi ve ark., 1999]. Günümüzde 20'den fazla IRT tanımlanmış durumdadır. TEM kökenli GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de tanımlanmış olmakla birlikte, enterik ve enterik olmayan pek çok bakteride de bulunabilecekleri bildirilmiştir. TEM grubu beta laktamazlar, *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır. Bu enzim daha nadir olarak *Capnocytophaga ochracea* ve *P. aureginosa*'da bulunmaktadır [Bradford, 2001; Gülay, 2001; Gür, 2004].

SHV Grubu GSBL'ler

Bu grup enzimlerin öncüsü olan SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'da bulunmaktadır Genellikle de kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır. Oksiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur [Sturenburg ve Mack, 2003]. SHV kökenli GSBL'lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha az olup, günümüzde sayıları yaklaşık 50 civarındadır. SHV türü enzimlerin ilk türevi 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. TEM grubu GSBL'lere kıyasla SHV-1'den köken alan enzim sayısı ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. Bunlarda karakteristik değişiklik 2. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir. SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P.*

aeuroginosa'da bildirilmiştir [Bradford, 2001]. Bu enzimlerden sadece bir tanesi (SHV-10) 'inhibitör dirençli' özellik göstermektedir [Bradford, 2001; Akova, 2004; Gür, 2004].

OXA Grubu GSBL'ler

OXA grubu enzimler Ambler grup D'de yer alan ve daha çok *P. aeuroginosa*'da bulunan GSBL'lerdir. Oksasiline yüksek afinite göstermeleri nedeniyle bu adı almışlardır Bu enzimlerin OXA-1 den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler [Bradford, 2001; Sturenburg ve Mack, 2003]. TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir [Livermore, 1995; Bush ve Miller, 1998; Nordman ve Guibert, 1998; Bradford, 2001; Gülay, 2001; Gniadkowski, 2001; Akova, 2004; Gür, 2004].

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Türkiye'de izole edilen bir *P. aureginosa* suşunda bulunmuştur. Daha sonra yine dünyada ilk kez OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17 beta laktamazları Türkiye'de izole edilen *P. aureginosa* suşlarında tanımlanmıştır [Gür, 2004; Bradford, 2001].

OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA- 17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır [Bradford, 2001]. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır [Aubert ve ark., 2001]. OXA-24 ayrıca karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Fakat bu GSBL değildir.

Bu enzim genlerinin çoğunluğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir. OXA enzimleri içinde OXA-20, OXA-10, OXA-24 gibi yeni tanımlanan enzimler karbapenemaz aktivitesi göstermektedir, bunlar GSBL değildir [Gülay, 2001; Gür, 2004; Bradford, 2001].

Beta-laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf bir biçimde inhibe edilirler. Bu tipteki enzimlerin birçoğu ülkemizden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır [Hall ve ark., 1993; Danel ve ark., 1998; Danel ve ark., 1999]. Bu enzimleri taşıyan psödomonasların en önemli özelliği seftazidime yüksek direnç göstermeleridir [Livermore, 1995]. Bu durumun tek istisnası OXA-17 olup, sefotaksim ve seftriaksona direnç sağlar [Danel ve ark., 1999]. OXA türü enzimler *P. aeruginosa* dışında *Acinetobacter baumannii* izolatlarında da tanımlanmıştır. Bu enzimlerden bazıları GSBL özelliği taşımamaktadır [Bradford, 2001].

CTX-M Grubu GSBL'ler

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni bir grup katılmıştır. CTX-M olarak tanımlanan bu grup beta laktamazlar substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir. Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak kadar önemli değildir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulonik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır [Bradford, 2001; Gülay, 2001; Sturenburg ve Mack, 2003; Akova, 2004; Gür, 2004].

İlk CTX-M beta laktamaz 1989 yılında Almanya'da *E. coli*' de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere bir çok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmış ve 1995 yılından itibaren büyük bir artış göstermiştir. Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır. CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2 bu grupta en yaygın olan enzimlerdir. Bu enzimler hem insanlarda hem de sağlıklı hayvanlarda izole edilmişlerdir. Yayılmaları hem plazmid hem de hareketli genetik elementlere bağlıdır. CTX-M enzimleri çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmalarda bulunmaktadır, ancak SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir [Bradford, 2001; Gülay, 2001; Sturenburg ve Mack, 2003; Akova, 2004; Gür, 2004].

TEM ve SHV kökenli enzimlerle en fazla % 40 civarında benzerlik göstermektedirler. Bu grup enzimlerin en önemli özelliği seftotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmeleridir [Bradford, 2001; Rup ve Feyy, 2003]. Benzer şekilde 1. kuşak sefalosporinlere benzilpenisiline kıyasla daha yüksek afinite gösterirler. Bu enzimi taşıyan mikroorganizmalar seftazidime klinik açıdan anlamlı direnç göstermezler. CTX-M türü enzimler yakın zamanda ülkemizde de gösterilmiştir [Açıkgöz ve ark., 2003].

PER tipi enzimler

Bu enzimlerden PER-I ülkemizde önce *Salmonella typhimurium*, takiben *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır [Vahaboğlu ve ark., 1996; Vahaboğlu ve ark., 1997; Altun ve ark., 2002]. PER-I ülkemiz dışında Fransa (Türkiye'den giden bir hastadan elde edilen bir izolatta) ve İtalya'da *P. aeruginosa* izolatlarında tanımlanmış ve yakın zamanda Güney Kore'den bildirilen bir raporda *Acinetobacter* izolatlarının % 56'sında bulunduğu gösterilmiştir [Bradford, 2001; Yong ve ark., 2003]. Bu grubun diğer üyesi PER-2 Arjantin'de *S. typhimurium* izolatlarında tanımlanmıştır [Bradford, 2001]. PER grubu enzimler özellikle seftazidim olmak üzere aminotiazolil sefalosporinlere direnç sağlarlar [Livermore, 1998]. Penisilinler bu enzimler için zayıf birer substrat olup, piperasilin *in vitro* olarak PER enzimlerine karşı aktivitesini korur. Beta-laktamaz inhibitörleri, sefamisinler ve karbapenemler de bu enzimlere karşı aktivite gösterirler.

Beta laktam inhibitörlere dirençli beta laktamazlar

Beta laktamaz inhibitörleri klinikte kullanılmaya başlandıktan sonra 1997 yılından itibaren bazı amoksisilin-klavulonik asite dirençli *E. coli*'ler bildirilmeye başlanmıştır. İnhibitörlere dirençli olan beta laktamazaların 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize edememelerine karşın TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'lerle birlikte ele alınmaktadırlar. Günümüzde inhibitörlere dirençli enzimlerin (IRT) sayısı 22 civarındadır.

IRT'ler en sık olarak *E. coli* de bulunmakla birlikte *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir.

İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulonik asit ve sulbaktama dirençli olmalarına karşın tazobaktama duyarlıdırlar [Bradford, 2001; Gülay, 2001; Gür, 2004].

Diğer GSBL'ler

Son yıllarda genişlemiş spektrumlu enzimlerden olup TEM, SHV, OXA veya CTX-M beta laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerden biri VEB-1 enzimidir. VEB-1 enzimi ilk kez Vietnam'da bir *E.coli* suşundan daha sonra Tayland'da bir *P. aeruginosa* suşundan elde edilmiştir [Bonomo ve ark., 1997; Chaibi ve ark., 1999]. CME-1 enzimi bir *Chryseobacterium meningosepticum* suşundan, TLA-1 bir *E.coli* suşundan elde edilmiştir. PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1 enzimleri % 50 homoloji göstermektedir ve oksiiimino sefalosporinlere özellikle seftazidime ve aztreonama etkilidirler [Vahaboğlu ve ark., 1995; Bradford, 2001; Chawong ve ark., 2001; Gülay, 2001; Gür 2004].

2.3. Genus *Klebsiella*

Klebsiella cinsi bakteriler *Enterobacteriaceae* ailesinin genel karakterlerini gösteren bazen ikişer ikişer, bazen kısa zincirler oluşturan 0.7-1.5x2.0-5.0 µm boyutlarında gram-negatif hareketsiz, sporsuz bakterilerdir. Genellikle kapsüllü çomakçıklardır [Bilgehan, 1996]. *Klebsiella* cinsi adını, 19.yy'ın sonlarında yaşamış, Alman mikrobiyologu Edwin Klebs'den almıştır. [Ustaçelebi ve ark., 1999]

Klebsiella cinsi bakteriler, insan ve hayvanların bağırsakları ile üst solunum yollarında ayrıca toprak ve sularda bulunurlar. İnsanlarda, genellikle pnömoni, idrar yolu infeksiyonları, otitis media, sinüzit, menenjit, prostatit, kolesistit,

peritonit daha az olmak üzere sepsis, karaciğer absesi gibi birçok hastalığa yol açmaktadırlar [Bilgehan, 1996]. Nosokomiyal ve fırsatçı infeksiyonların en başta gelen etkenleri arasındadırlar.

Klebsiella cinsinde önemli yedi tür bulunmaktadır:

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella oxytoca

Klebsiella ozaenae

Klebsiella rhinoscleromatis

Klebsiella planticola

Klebsiella terrigena

Klebsiella ornithinolytica

Klebsiella cinsi bakterilerin önemli bir özelliği, polisakkarit kapsüllü yapısıdır. Katı besiyerinde büyük, mukoid koloniler yapar. Klebsiella cinsi bakteriler, ısıya dayanıksız olup 55°C'de 30 dakikada ölürlür. Ancak oda sıcaklığında ve +4°C soğukta haftalarca canlı kalırlar [Ustaçelebi ve ark., 1999]. Kuruluğa oldukça dirençlidirler. Üremeleri için kan, serum, asit sıvısı, glikoz gibi özel besin maddelerine gereksinim duymazlar [Bilgehan, 1996].

2.3.1 Biyokimyasal özellikleri

Klebsiella'lar fermentatif bakterilerdir. Birçok şekeri fermente etmelerine rağmen bu konuda kökenler arasında birliktelik yoktur. Hareketsiz bakterilerdir. Karbon kaynağı olarak malonat ve sitratı kullanırlar. *Klebsiella rhinoscleromatis* ise sitratı kullanamaz. Diğer tüm *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde olduğu gibi oksidaz etkinlikleri yoktur. Klebsiella cinsi bakteriler deoksiribonükleaz (DNAse) enzim aktivitesine sahip değildir. *Klebsiella* cinsi bakterilerin *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* cinsi bakterilerin ayırımında hareket yetenekleri ve DNAse enzim aktiviteleri araştırılır. *Klebsiella*'lar hareketsiz, diğerleri hareketlidir.

Klebsiella cinsi bakteriler, tüm barsak bakterileri gibi genel kullanım besiyerlerinde ürerler. Optimal 37°C'de ve pH 7'de iyi ürerler. Aerob ve fakültatif anaeropturlar. Katı besiyerindeki kolonileri, tipik mukoid nitelikte büyük, sarımtırak gri renkte ve akıcı kolonilerdir. McConkey agarda koloniler tipik olarak büyük, mukoid ve kırmızı renktedir. Agar çevresine diffüze olan kırmızı pigment laktoz fermantasyonunu ve asit üretimini gösterir.

2.3.2. Antijen yapıları

Polisakkarit yapısında O ve K antijenleri bulunmaktadır. Bugün K antijenine bağlı tiplendirme ön planda uygulanmaktadır. Bunun nedenleri: K antijeni ile tiplendirmenin daha kolay olması, K antijenlerinin O antijenlerinin tepkimelerini engellemeleri ve K antijenleri sayısının O antijenlerinin sayısından fazla olmasıdır. 82 tip K antijeninin varlığına karşın sadece 12 tip O antijeninin tanımlanmasının nedeni; K antijenlerinin O antijenlerinin üzerini kaplaması nedeniyle O antijenlerinin tayininin zor olmasıdır. Bu antijenlere karşı elde edilmiş antiserumlarla lam ve tüp aglütinasyonları, kültür süzöntüsü ile presipitasyon ve Neufeld'in kapsül şişme reaksiyonu ile *Klebsiella*'lar tiplendirilebilir. Kapsül şişme reaksiyonunda; özgül serumlarla karşılaştırılan bakterilerin kapsül polisakkaritlerinde oluşan presipitasyon sonucunda kapsül periferinde opak bir çevre oluşmakta olup kapsül şişmiş gibi görünmektedir [Bilgehan, 1996].

2.3.3. Virülans faktörleri

Klebsiella cinsi bakterilerin geniş polisakkarit kapsülü, bakteri hücrelerini fagositozdan koruyan önemli bir virülans faktörüdür. Ayrıca infekte bölgeye lökosit göçünü geciktirir. *Klebsiella*'larda kapsül ve lipopolisakkaritlerde bulunan endotoksin dışında moleküler düzeyde herhangi bir virülans faktörü tanımlanmamıştır. *Klebsiella*'larda konak organizmadan demir iyonu sağlayabilen sideroforların varlığı gösterilmiştir. Sideroforlar yayılcı sistemik infeksiyon oluşturmada esansiyel bir faktör olan demir sağlayarak

mikroorganizmaların işini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca "adhezyon" denen yapışma yeteneği de virulans ile ilgilidir. Fimbrialar yapışmadan sorumlu en önemli yüzey adhezinleri ya da ligantlarıdır. Fimbrialar genellikle gram-negatif bakterilerde bulunurlar fakat bazı gram-pozitif bakterilerde de bulunabilirler. Çok kırılğan olan fimbrialar sürekli olarak kaybedilir ve yerlerine yenileri yapılır. Konak bakteri fimbrialarının, uç kısımlarına karşı antikor üretebilir. Bu antikorlar fimbriaların uç kısımlarına bağlanarak onların özgül reseptörlerine bağlanmasını engellerler. İdrar yolu infeksiyonuna yol açan bazı bakteriler, buna rağmen yeni fimbrialar yaparak konağın immun yanıtını aşabilirler.

2.3.4. Etken oldukları klinik tablolar

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda %5-10 oranında *Klebsiella pneumoniae* bulunmaktadır. Nadir olarak normal kişilerin orofarinkslerinde bulunur (Taşıyıcı oranı %1-6). Doğada da çok yaygın olarak bulunmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* tipik lobar pnömoni oluşturur. Hem hastane ortamından hem de toplumdan kazanılan bir hastalık olmasına karşın fırsatçı bir infeksiyon etkeni olarak değerlendirilebilir. Çünkü *Klebsiella pneumoniae* solunum yolları savunma sistemi bozuk olan alkolizm, diabetes mellitus, kronik tıkalı akciğer hastalığı gibi ağır bir problemi olan kişilerde görülür. Sinsi başlar. Bazı olgularda bronko pnömoni veya bronşit şeklinde gelişir. Tipik olarak ağır ve akciğerlerde de strüktif değişikliklerle seyreder. Nekrotik inflamasyon ve hemorajiler oluşturur. Balgam kalın, mukoid ve kiremit kırmızısı renginde veya ince ve jel gibi olabilir. Abse oluşumu, ampiyem, plevra sıvısı oluşma ihtimali yüksektir. Bu hastalarda ölüm oranı da yüksektir. Tedavide kombine antibiyotiklerin kullanıldığı güçlü bir yol izlenmelidir. Pnömoni olgularından K₁ K₃ K₄ ve K₅ antijenine sahip K tipleri sıklıkla izole edilmektedir [Ustaçelebi ve ark., 1999]. *Klebsiella pneumoniae* pnömoniden başka üriner yol infeksiyonlarına, yara infeksiyonlarına ve bakteriyemiye yol açar. Pnömoni yapan K tipleri üriner yol infeksiyonlarından da izole edilmektedir. Yeni doğan ünitelerinde plazmid ile yönetilen çoklu dirençli *Klebsiella*'lara bağlı hastane infeksiyonları görülür. İnfeksiyonlar

pnömoni, üriner sistem infeksiyonları ve bakteriyemiler şeklinde olabilir. *Klebsiella*'lar hastane infeksiyonlarının %5'inden sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda yapılan bir araştırmada hastanede yatan kişilerdeki üriner infeksiyonların %9'undan ve bütün primer bakteriyemilerin %14'ünden *Klebsiella*'lar izole edilmiştir [Ustaçelebi ve ark., 1999]. *Klebsiella*'ların diğer tipleri daha az oranda hastane infeksiyonu etkenidir. *Klebsiella oxytoca* idrar, burun akıntısı ve beyin apselerinden izole edilmiştir. *Klebsiella ozaenae* bir çeşit kronik atrofik rinit olan ve "ozena" denen duruma yol açar. *Klebsiella ozaenae*'nin sebep olduğu korneal abse vakası bildirilmiştir. Dışkıdan izolasyonu çok sıktır, çok nadir olarak pnömonilerle ilişkili bulunmaktadır. *Klebsiella rhinoscleromatis* üst solunum yolu infeksiyonları ile ilişkilidir. "Rinoskleroma" denen burun ve üst solunum yolu (farenks) mukozasının katıldığı kronik granülomatöz bir hastalıktan sorumludur. Yeni isimlendirilen türler olan *Klebsiella planticola* ve *Klebsiella terrigena* doğada oldukça yaygın olarak bulunur. *Klebsiella planticola* insan, idrar, kan ve solunum yollarından izole edilmiştir. *Klebsiella ornithinolytica* türünün ise insan idrar, kan ve solunum yolu sekresyonu gibi klinik örneklerden izolasyonu bildirilmiştir [Ustaçelebi ve ark., 1999].

Klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* türleri arasında en yüksek oranda *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* bulunmaktadır. *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* bakterileri antibiyotiklere gittikçe direnç kazanmaktadır ve beta laktamaz enzim aktivitesine de sahiptir. Aynı zamanda genişlemiş spektrumlu enzim aktivitesine sahiptir.

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Örnek Toplama

Araştırmada, iki farklı hastanenin (Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen hasta materyalleri çalışılmıştır. Hasta materyalleri ilk aşamada EMB agara ekilmiştir.

3.2. Örneklerin Seçilmesi

İdrardan, kandan, yara yerinden, trakeal aspirattan, aspirasyon sıvısından ve balgamdan alınan örnekler, EMB (Oxoid CM0069) agara ekildikten sonra 37°C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. EMB (Oxoid CM0069) agarda gri kahverengi merkezli mukoid koloniler *Klebsiella* oldukları şüphesiyle biyokimyasal testlere alınmıştır. Gram boyamaları yapılmış gram-negatif basil oldukları görülmüştür.

3.3. İdentifikasyon

Şüpheli koloniler tek koloni oluşturmaları için EMB (Oxoid CM0069) agara pasajlanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra saf kültürler ilk olarak gram boyama yapılmıştır. Gram boyama sonucu gram-negatif olan kültürler oksidaz testine tabi tutulmuştur. Oksidaz negatif olan kültürler sırasıyla IMVIC testine alınmışlardır. Daha sonra ürel agara (Christensen agar base, Oxoid CM0053), Lysine Decarboxylase besiyerine, TSI besiyerine ve Mio medium'a ekilerek adlandırılmışlardır. Klasik biyoşimi testleriyle adlandırılan *Klebsiella* bakterileri doğrulama amacıyla API 20E (bio-Merieux) ticari test kitleri kullanılarak da adlandırılmışlardır.

IMVIC test grubu İndol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer ve Sitrat testlerinden oluşmuştur. Şüphe edilen bakteri kolonisi iğne öze yardımıyla

alınıp İndol testi için triptofanlı besiyerine, daha sonra sırasıyla Metil Kırmızısı ve Voges Proskauer testleri için MR/VP besiyerine ve sitrat besiyerine ekilmiştir. *Klebsiella* bakterileri için IMVIC test sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Klebsiella* türleri için IMVIC test sonuçları

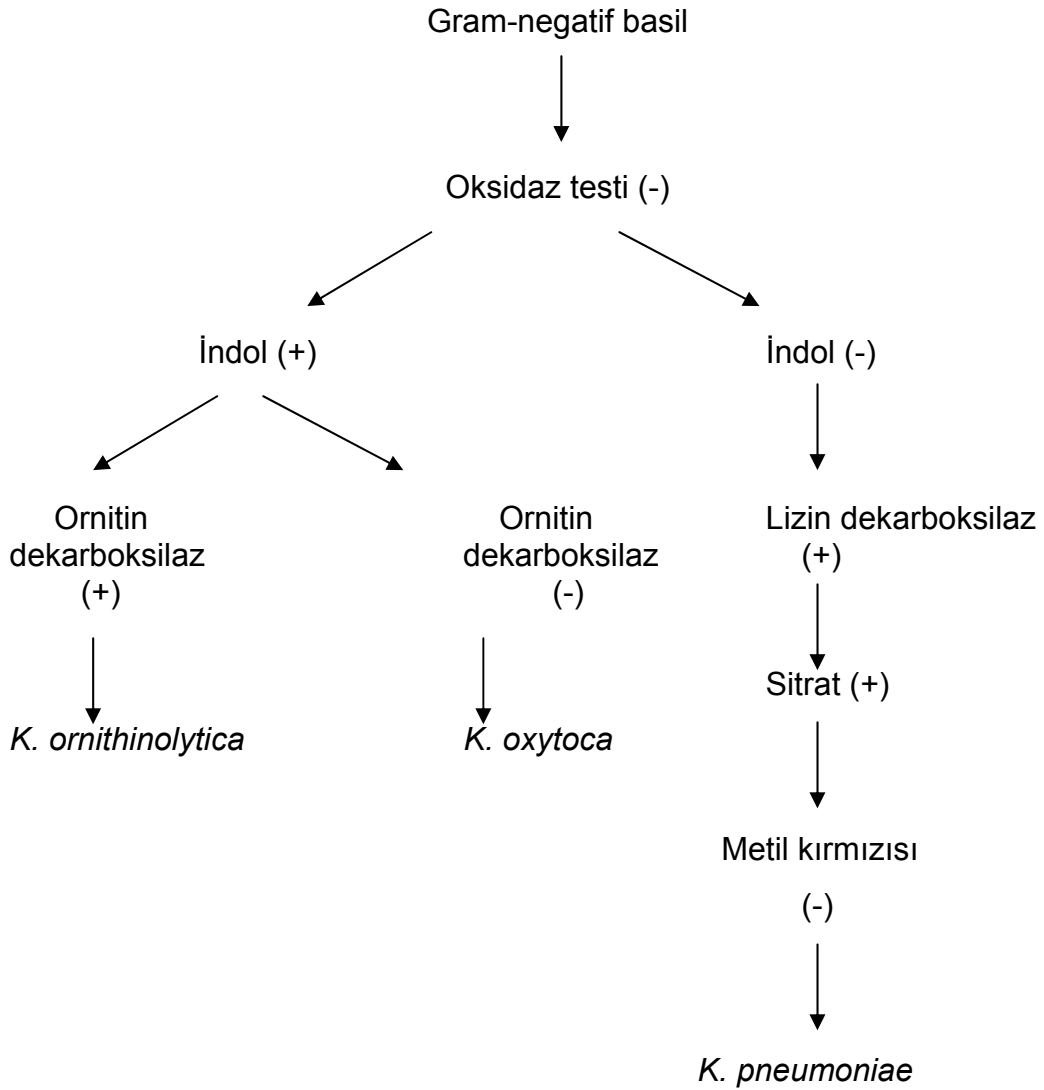
<i>Klebsiella</i> bakterileri	IMVIC test grubu			
	İndol	Metil kırmızısı	Voges Proskauer	Sitrat
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	+

İzole edilen bakteriler Mio medium besiyerine ekilmişlerdir. Bu besiyeri bakterilerin hareket özelliklerini, ornitini kullanmalarını test etmektedir. Ayrıca damlatılan kovaks ayırıcı ile indol testi yapmaktadır. Buna göre izole edilen bakterilerin Mio besiyerindeki reaksiyonları çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *E. coli* ve *Klebsiella* bakterilerin Mio besiyerindeki reaksiyonları

Bakteriler	Mio medium besiyerindeki reaksiyonlar		
	Hareket	Ornitin	İndol
<i>E.coli</i>	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	+

İzole edilen bakteriler üreli (Christensen agar base, Oxoid CM0053) agara ekilmişlerdir. Besiyeri 35°C’de 18-24 saat inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türleri için üreaz aktivitesi pozitifdir. Şekil 3.1’de *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* türlerinin isimlendirilmesinde kullanılan biyoşimik testler verilmiştir.



Şekil 3.1. *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* türlerinin isimlendirilmesinde kullanılan biyokimik testler

API 20E identifikasyon kitinin kullanımı

Klinik izolatlar ayrıca API 20 E (bio-Merieux) ticari kitleri kullanılarak adlandırılmışlardır. API 20 E (bio-Merieux) *Enterobacteriaceae* familyasına ait gram-negatif bakterileri ve diğer bazı gram-negatif bakterilerin adlandırılmasında kullanılan hızlı identifikasyon sistemidir. 21 adet farklı biyokimyasal test içerir. Bu testler ONPG, arjinin, lizin, ornitin, citrat, indol, jelatinaz, glukoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sükroz, melibioz, amygdalin, arabinoz, oksidaz, triptofan deaminaz, triptofan indol üretimi, üre,

sodium tiyosülfat testlerinden oluşur. Bu testler çizelge 3.3'de verilmiştir. Saf koloni öze yardımıyla test sistemi içinde bulunan API suspansiyon medium (5 ml) içine 0,5 McFarland olacak şekilde karıştırılır. İnkübasyon kutularına pipet yardımıyla dağıtılır, altı çizili ADH, LDC, ODC, H₂S ve URE kutularının üzerine bakteri süspansiyonundan sonra anaerobik ortam oluşturmak üzere, üzeri mineral yağ ile kapatılır. Bu işlemden sonra API 20 E (bio-Merieux) kapatılır ve 37°C'de bir günlük inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda belirtilen kutulara ayıraçları damlatılarak belirtilen sürelerden sonra sonuçlar bilgisayar programında değerlendirilir.

Çizelge 3.3 API 20 E (bio-Merieux) test sisteminde yer alan biyokimyasal testler ve test sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

Testler	Substrat	Reaksiyon/Enzim	Sonuçlar	
			Negatif	Pozitif
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranosite	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
ADH	Arjinin	Arjinin dehidrolaz	Sarı	Kırmızı /Oranj
LDC	Lizin	Lizin dekarboksilaz	Sarı	Oranj
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	sarı	Kırmızı /oranj
CİT	Sodium sitrat	Sitrat kullanımı	Soluk yeşil /Sarı	Mavi-yeşil /Sarı
H ₂ S	Sodyum tiyosülfat	H ₂ S üretimi	Renksiz /gri	Siyah dip
URE	Üre	Üreaz	Sarı	Kırmızı /oranj
TDA	Triptofan	Triptofan deaminaz	Sarı	Koyu kahverengi
İND	Triptofan	İndol üretimi	Soluk yeşil /Sarı	Pembe
VP	Sodyum piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe /kırmızı
GEL	Jelatin	Jelatinaz	Difüze olmamış	Difüze olmuş siyah pigment
GLU	Glukoz	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
MAN	Mannitol	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
İNO	İnositol	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
SOR	Sorbitol	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı

Çizelge 3.3. (Devam) API 20 E (bio-Merieux) test sisteminde yer alan biyokimyasal testler ve test sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

RHA	Rhamnoz	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
SAC	Sukroz	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
MEL	Melibioz	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
AMY	Amygdalin	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
ARA	Arabinoz	Fermantasyon /oksidasyon	Mavi/mavi yeşil	Sarı
OX	Filtre kağıdı üzerine	Sitokrom-oksidaz	Sarı	kırmızı

Çizelge 3.4. API 20 E (bio-Merieux) test sisteminde kullanılan ayıraçlar

Test	Ayıraç damlatılacak kuyu	Ayıraç	Bekleme süresi	Sonuç	
				Negatif	Pozitif
TDA	TDA	1 damla TDA reagent	Hemen okunur	Sarı	Koyu kahve
IND	İND	1 damla İND reagent	2 dakika	Sarı halka	Kırmızı halka
VP	VP	1 damla VP1 1 damla VP2	10 dakika	Renksiz	Pembe /kırmızı
NO ₂	Glukoz	1 damla NİT1 1 damla NİT2	2-3 dakika	Sarı	Kırmızı
N ₂ indirgeme	Glukoz	1damla ZN	5 dakika	Kırmızı	Sarı
OX	Filtre kağıdı üzerine alınmış bakteri	1 damla OX ayırıcı	1-2 dakika	Renksiz	Menekşe rengi

3.4. GSBL enziminin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi

3.4.1. Çift Disk Sinerji Testi

Araştırmada kullanılan *Klebsiella* bakterilerinin 0,5 McFarland eşeline uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. Mueller Hinton Agar'a (MHA) ekilmişlerdir. Plâğın ortasına amoksisilin/klavulonik asit (1/2, 30 µg), etrafına disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 30 mm olacak şekilde, aztreonam (30 µg), seftazidim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. NCCLS kriterlerine uygun olarak zon çaplarının küçük olduğu dirençli suşlarda diskler arası uzaklık 25mm, 20mm, 15mm olacak şekilde yaklaştırılarak test tekrarlanmıştır. Daha sonra plaklar 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda zon çapları ölçülerek amoksisilin/klavulonik asit (1/2, 30 µg) ve diğer antibiyotik diskleri arasında bakterinin üremediği bir sinerji alanı oluşturan plaklar GSBL pozitif kabul edilmiştir [Siro, 1996; Emery ve Weymouth, 1997; Schooneveldt ve ark., 1998; NCCLS, 2003]. Çift Disk Sinerji kullanılan antibiyotiklerin NCCLS kriterlerindeki zon çapları Çizelge 3. 5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Çift Disk Sinerji kullanılan antibiyotiklerin NCCLS kriterlerindeki zon çapları

Antibiyotik ismi	Sembol	Konsantrasyon	Zon çapı	
			S	R
Amoksisilin/ Klavulonik asit	AMC	1/2, 30 µg	≥18	≤13
Aztreonam	AZ	30 µg	≥22	≤15
Seftazidim	CAZ	30 µg	≥18	≤14
Seftriakson	CRO	30 µg	≥21	≤13
Sefotaksim	CTX	30 µg	≥23	≤14

S: Duyarlı, R: Dirençli

3.4.2. Klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı

Bakterilerin 0,5 McFarland eşeline uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. MHA'a ekilmişlerdir. Seftazidim (30 µg) ,seftazidim/klavulonik asit, sefotaksim ve sefotaksim/klavulonik asit diskleri yerleştirilmiştir. 37°C'lik etüvde 24 saat bekletildikten sonra oluşan zonlar ölçülmüş, Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir [Gülay, 2001; Sturenburg ve Mack, 2003; NCCLS, 2003; Gür, 2004; Colodner, 2005].

3.5. GSBL enziminin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler (PZR-RFLP)

Araştırmada genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enziminin tanımlanmasında moleküler yöntem olarak PZR-RFLP yöntemi çalışılmıştır. Araştırmada isimlendirilen izolatların total DNA'ları elde edildikten sonra PZR işlemi gerçekleştirilmiş, amplifiye edilen ürünler *NheI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir.

3.5.1. Kromozomal DNA izolasyonu

Suşlar Nutrient agara tek koloni olarak ekilmiş ve 12 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün tek kolonilerden seçilerek birkaç koloni 0,1 ml steril distile suya aktarılmıştır. Hücreleri parçalamak için karışım 10 dakika kaynatılmıştır. Oluşan hücre lizati 10 sn 10 000 rpm'de santrifüj edilmiş ve 15 µl süpernatant alınarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) karışımında DNA örneği olarak kullanılmıştır. Elde edilen DNA pelletleri -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır [Ceron ve ark., 1995].

3.5.2. Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3. 6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. GSBL tiplerinin belirlenmesi için seçilen primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri

Primerler	Nükleotid dizisi(5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)	PZR ürünü büyüklüğü (bp)
SHV-F	CGCCTGTGTATTATCTCCCT	60	293
SHV-R	CGAGTAGTCCACCAGATCCT	62	
TEM-F	TCG GGG AAA TGT GCG	60	966
TEM-R	TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	62	

3.5.3. PZR ile GSBL genlerinin analizi ve GSBL tiplerinin belirlenmesi

PZR işlemi için 5 µl Taq tamponu (10x), 4 µl MgCl₂, 1 µl dNTP, 0,5 µl primer, 1 µl kalıp DNA ve 0,1 µl Taq enzimi ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi distile su ile 50 µl' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PZR cihazına (Biometra) yerleştirilmiş ve her bir GSBL tipi için aşağıda verilen program kullanılmıştır.

94 °C' de	45 sn	Başlangıç denatürasyon aşaması
60 °C' de	45 sn	45 döngü
72 °C' de	1 dk	
72 °C' de	3 dk	Son uzama aşaması

Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jeller hazırlanarak yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapılmıştır.

3.5.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin yürütülmesinde 1xTAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış % 2' lik agaroz jel kullanılmıştır. Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel

tabaklarının büyüklüğü 70x70 mm'dir. Örneklerin 20 µl'si boyama tamponu ile boyanmış ve hazırlanan jele yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 1xTAE tamponu içinde 70 V' ta 3–3,5 saat süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda PZR bantlarının görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (Biometra BioDoc Analyze) UV ışık altında yapılmıştır. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Taq polimeraz tamponu 10x:
1000 mM Tris-HCL, pH 8.3
500 mM KCl
1mg/ml jelatin karıştırılarak hazırlanmıştır.
- MgCl₂: 25 mM kullanılmıştır.
- Nükleotid Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) kullanılmıştır
- Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH 8.0)
242 g Tris,
57,1 ml Glasial asetik asit,
0,5 M 100 ml EDTA (pH 8.0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.
- Agaroz: %2' lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Yükleme tamponu:
40 gr sükroz
0,025 gr bromofenol mavisi
0,25 gr ksilen siyanol
100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
- Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.
- Taq polimeraz: 5 u/ µl kullanılmıştır.

3.5.5. Gram-negatif bakterilerden plazmit DNA izolasyonu

Tanımlanan türlerin plazmit DNA izolasyonları Sambrook'un tanımladığı yöntemle yapılmıştır. İzole edilen suşlar 5ml'lik Luria Bertani (LB) besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreyen bakteri kültürünün tamamı aşamalı olarak ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 100 µl çözelti I'den ilave edilmiş vortekslenerek homojen hale getirilmiştir. Sonra üzerine 200 µl çözelti II'den ilave edilmiş pelet 3-4 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra buzda 5 dk bekletilmiştir. Üzerine 150 µl çözelti III'den koyulmuş ve hafifçe vortekslenmiştir. Buzda yine 5 dk bekletilmiştir. Sonra 12.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz steril bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 450 µl fenol-kloroform (1: 1) ilave edilerek hızla karıştırılmıştır. Daha sonra sıvı faz 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Tekrar üst faz steril bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 500 µl saf etil alkol eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üzerine 1 ml % 76'lık etil alkol ilave edilmiş ve 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Sonra üst faz uzaklaştırılarak kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'lar kurutulmuş ve üzerlerine 70 µl Tris-EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. Plazmit DNA -20°C' de saklanmıştır [Sambrook ve ark., 1989].

3.5.6. Plazmid DNA için agaroz jel elektroforezi

Plazmit DNA'ların yürütülmesinde 1xTAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış % 0,8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel tabaklarının büyüklüğü 70x70 mm'dir. Elektroforez işleminden önce RNA'nın parçalanması için plazmit DNA'lara 1 µl RNaz çözeltisi ilave edilmiş ve 1 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin 20 µl'si boyama tamponu ile boyanmış ve hazırlanan jele yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 1xTAE tamponu içinde 70 V' ta 3–3,5 saat süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda

plazmit DNA'ların görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (Biometra BioDoc Analyze) UV ışık altında yapılmıştır. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir.

3.5.7. Plazmit DNA büyüklüklerinin hesaplanması

Suşların plazmit DNA büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler ağırlıkları bilinen DNA belirteçlerinin (markırlarının) elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkidir yararlanılmıştır. Belirteç (markır) DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistiksel analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek bakterilerden izole edilen plazmitlerin büyüklükleri saptanmıştır.

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G.C)}{B - (G.A)} \quad (3.1)$$

$$\text{Korelasyon Katsayısı (J)} = \frac{E - (G.C)}{\sqrt{[D - (H.C)] \cdot [B - (G.A)]}} \quad (3.2)$$

$$\text{Moleküler büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10} [I \cdot (\alpha - G) + H] \quad (3.3)$$

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n \quad (3.4)$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2 \quad (3.5)$$

$$C = \log_{10} Y_1 + \log_{10} Y_2 + \log_{10} Y_3 + \dots + \log_{10} Y_n \quad (3.6)$$

$$D = (\log_{10} Y_1)^2 + (\log_{10} Y_2)^2 + (\log_{10} Y_3)^2 + \dots + (\log_{10} Y_n)^2 \quad (3.7)$$

$$E = X_1(\log_{10} Y_1) + X_2(\log_{10} Y_2) + X_3(\log_{10} Y_3) + \dots + X_n(\log_{10} Y_n) \quad (3.8)$$

$$\text{Ortalama X (G)} = \frac{A}{N} \quad (3.9)$$

$$\text{Ortalama Y (H)} = \frac{C}{N} \quad (3.10)$$

X= Markır DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y= Markır DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

A= Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmitin jel üzerindeki göçü

Gram (-) Bakterilerden Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

- Çözelti I: 50 mM glukoz, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) karıştırılarak hazırlanmış ve +4 ° C' de saklanmıştır.
- Çözelti II: 0,2N NaOH (taze hazırlanan 10N stoktan) ve %1 SDS karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Çözelti III: 5M 60 ml potasyum asetat, 11,5ml glasiyel asetik asit son hacim 100 ml olacak şekilde suda çözülerek hazırlanmıştır.
- Fenol : Kloroform (1:1) çözeltisi: Fenol ve kloroform eşit hacimde karıştırılarak hazırlanmıştır.
- %76'lık alkol: %100'lük 76 ml etil alkol, 24 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.
- %100'lük alkol kullanılmıştır.
- RNaz Çözeltisi: RNaz 10 mg/ml olacak şekilde 0,01 M sodyum asetat (pH 5,2) çözeltisi içinde çözülmüştür. 15 dakika 100 °C' de bekletilmiş ve oda sıcaklığında yavaş yavaş soğutulmuştur. Çözeltinin pH'sını ayarlamak için 1 M Tris-HCl (pH 7,4) çözeltisinden 0,1 hacim ilave edilmiş, karıştırılarak -20 °C' de saklanmıştır.
- Tris-EDTA tamponu (TE): 10 mM Tris, 1 mM EDTA'da çözülerek hazırlanmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH 8.0): 242 g Tris, 57,1 ml Glasiyell asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8.0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.
- Agaroz: %0,8' lik ve %2' lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

- Yükleme tamponu: 40 gr süktroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
- Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

3.5.8 Amplifikasyon Ürünlerinin Kesimi İçin Kullanılan Restriksiyon Enzimi

*Nhe*I Enzimi (Vivantis) : 5'.....G*CTAGC....3'
3'.....CGATC*G....5'

* Enzim Kesim Bölgesi

3.5.9 PZR Ürünlerinin *Nhe*I Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Amplifiye edilen ürünler *Nhe*I restriksiyon enzimi ile kesilmiştir

*Nhe*I enzimi ile kesim işlemi:

*Nhe*I enzimi: 1 µl (10 ünite)

*Nhe*I enzim tamponu: 2 µl

Amplifiye ürün: 12 µl

Distile su: 5 µl

Toplam Hacim: 20 µl

Toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı; 37 °C' de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda 10 µl' lik kesim ürünü, etidyum bromür içeren % 3'lük agaroz jel elektroforezine yüklendi. Ultraviyole ışığında *Nhe*I enzimi ile elde edilen bantlar incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

3.6. İstatistiksel analiz

GSBL varlığının tespitinde kullanılan çift disk sinerji yöntemi ve klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemlerinin isttistiksel olarak karşılaştırılmasında *t* testi kullanılmıştır.

3.7. Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

3.7.1. EMB agar (Oxoid CM0069)

Pepton	10 g	
Laktoz	5 g	
Sükroz	5 g	
K ₂ HPO ₄	2 g	
Agar	13,5 g	
Eozin Y	0,4 g	(%2 lik eriyikten 2 ml)
Metilen mavisi	0,065 g	(%3,25 eriyikten 0,2 ml)
Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.		
pH:7,1		

Karıştırılıp kaynatılarak eritilir ve Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.7.2. TSI (Üç şekerli demirli agar) (Oxoid CM0277, UK)

Poliipepton	20 g
Laktoz	10 g
Sükroz	10 g
Dekstroz	1 g
NaCl	5 g
Ferrik amonyum sülfat	0,2 g
Sodyum tiosülfat	0,2 g
Agar	13 g
Fenol kırmızısı	0,025 g
Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	
pH: 7,3	

Maddeler karıştırılır ve deney tüplerine 7-8 ml kadar dağıtılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir. Dipte 2,5-3cm dik bir kısım ve üstte yatık bir kısım oluşacak şekilde katılaştırılır.

3.7.3. İndol besiyeri (Oxoid CM87) ve Kovacs ayıracı

İndol Besiyeri:

Pepton yada pankreatik kazein	2 g
NaCl	0,5 g
Saf su	100 ml
Son pH: 7,2	

Maddeler ısıtılarak eritilir. Tüplere 3-5 ml kadar dağıtılarak Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

Kovacs ayıracı:

Saf amil yada isoamil alkol	150 ml
P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
HCl konsantre	50 ml

Kovacs ayıracı tüp kenarından akıtılarak besiyeri üzerinde tabakalandırılır. Birkaç saniye içinde besiyeri ile ayıraç arasında parlak kırmızı halkanın oluşması olumlu sonuç olarak kabul edilir.

3.7.4. Metil Red/ Voges Proskauer (MR/VP) besiyeri ve ayıraçları (Merck 1.05712 0.500)

Besiyeri:

Polipepton	7 g
Glukoz	5 g

K_2HPO_4 5 g

Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Maddeler hafifçe ısıtılarak suda eritilir. Soğuduktan sonra pH'sı 6,9'a ayarlanır ve 1000 ml' ye tamamlanır. Tüplere 5'er ml konarak Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

Metil kırmızısı ayıracı:

Metil kırmızısı	0,05 g
Etil alkol %95 lik	150 ml
Saf su	100 ml

Önce metil kırmızısı alkolde eritilir. Sonra su eklenir oda sıcaklığında saklanabilir. MR/VP besiyerine saf kültürden ekilen bakteri 35°C ' de 48 saat ünkübe edilir. Kültür içerisine 5-6 damla ayıraç damlatılır.

Voges Proskauer ayıracı:

1. Alfa naftol	5 g
Absolu etil alkol	100 ml
2. KOH	10 g
Saf su	100 ml

MR/VP besiyerine saf kültürden ekilen bakteri 35°C'de 24 saat ünkübe edilir. 5 ml kültür süspansiyonunun üzerine 0,6 ml alfa naftol ayıracından, 0,2 ml KOH ayıracından damlatılır. Besiyerinin hava ile teması için çalkalanıp 10-15 dakika bekletilir.

3.7.5. Simon's citrate agar (Oxoid BO0379, UK)

Sodyum sitrat 2 g

NaCl	5 g
MgSO ₄	0,2 g
NH ₃ H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Bromtimol mavisi	0,080 g
Agar	15 g
Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	
pH:6,9	

Maddeler karıştırılır ve sıcak su banyosunda eritilir. Deney tüplerine 5'er ml dağıtılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir. Yatık durumda katılaştırılır.

3.7.6. Ürea agar base (Oxoid CM0053)

Pepton	1 gr
Glukoz	1 gr
NaCl	5 gr
Na ₂ HPO	1,2 gr
KH ₂ PO ₄	0,8 gr
Fenol kırmızısı	0,012 gr
Agar	15 gr

Bileşenlerden belirtilen miktarda alınıp 95 ml distile su içerisinde çözülür. Agar eriyene kadar kaynatılır. Otoklavda 115°C'de 20 dakika steril edilir. Besiyerinin ısı 50°C'ye kadar inince, milipor ile steril edilmiş %40'luk 5 ml üre besiyerine eklenir ve tüplere dağıtılır ve donması beklenir.

3.7.7. Mio (Motility Indole Ornithine) medium (Difco TM 273520)

Maya özütü	3 g
Pepton	10 g

Trypton	10 g
L-ornitihine HCl	5 g
Dekstroz	1 g
Agar	2 g
Brom kresol moru	0,02 g
Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

Karıştırılıp kaynatılarak eritilir. Deney tüplerine 5'er ml dağıtılır ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.7.8. Mueller-Hinton agar (Oxoid CM0337)

Et özütü	300 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	10 g
Distile su ile	1000 ml'ye tamamlanır.

Karıştırılıp kaynatılarak eritilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir. Soğuduktan sonra plaklara dökülür.

3.7.9. Difco™ Lysine decarboxylase broth (211759)

Peptone	5,0 g
Maya özütü	3,0 g
Dekstroz	1,0 g
L-Lysine	5,0 g
Brom kresol moru	0,02 g
Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	
Son pH: 6,8± 0,2	

Besiyeri hazırlanıp deney tüplerine 5'er ml dağıtılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.7.10. Luria Bertani Sıvı (LB) Besiyeri (Oxoid)

Maya özütü	5g
Pepton	10g
NaCl	10g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Besiyeri hazırlanıp deney tüplerine 10'ar ml dağıtılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

3.7.11. Nutrient Agar (NA) Besiyeri (Oxoid CM3)

Et Özütü (beef extract)	1g
Maya özütü (yeast ekstrat)	2g
Pepton	5g
NaCl	5g
Agar	15g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

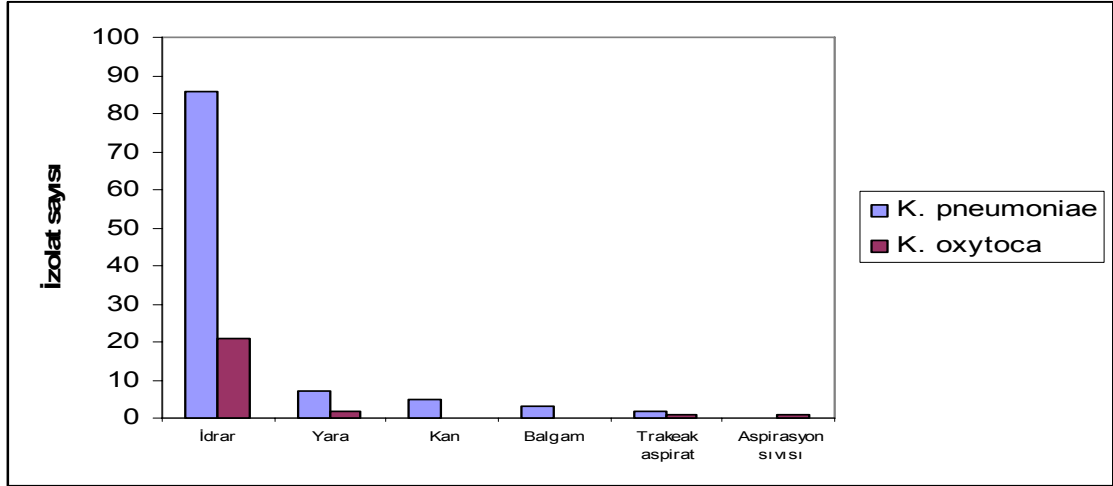
Besiyeri hazırlanıp deney tüplerine 10'ar ml dağıtılır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir.

4. BULGULAR

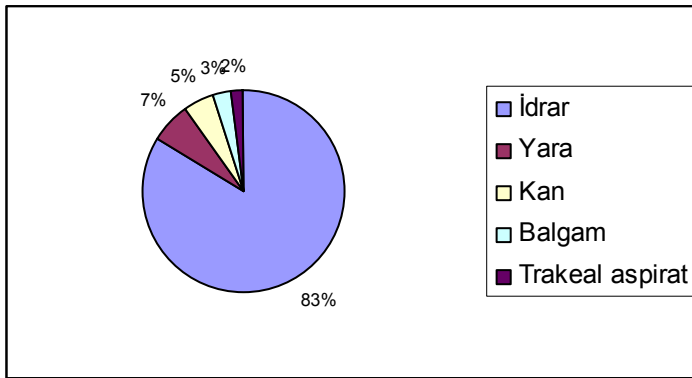
Araştırmada, farklı hastanelerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen 128 hasta materyali çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan 128 hasta materyalinin 107 (%83,6)'si idrar, 9 (%7,03)'u yara, 5 (%3,9)'i kan, 3 (%2,34)'ü balgam, 3 (%2,34)'ü trakeal aspirat, 1 (%0,78)'i aspirasyon sıvısı'dır. Bu hasta materyalleri EMB agar'da kültüre edildikten sonra klasik biyoşimi testleri ile isimlendirilmiş, ardından API 20E identifikasyon kiti ile isimlendirilmeleri doğrulanmıştır. 128 *Klebsiella* bakterisinin identifikasyonu sonucu 103 *K. pneumoniae*, 25 *K. oxytoca* elde edilmiştir. Hasta materyallerinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir. Hasta materyallerinin tür bazında dağılımı yapıldığında 103 *K. pneumoniae* 'nin 86 (%83)'si idrar, 7 (%7)'si yara, 5 (%5)'i kan, 3 (%3)'ü balgam, 2 (%2)'si trakeal aspirat kültürlerinden izole edilmiştir. 25 *K. oxytoca*'nın 21 (%84)'i idrar, 2 (%8)'si yara, 1 (%4)'i trakeal aspirattan, 1 (%4)'i aspirasyon sıvısı kültürlerinden izole edilmiştir. Hasta materyallerinin 103 *K. pneumoniae* ve 25 *K. oxytoca* türlerine göre dağılımı Şekil 4.2 ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. 128 Hasta materyalinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı

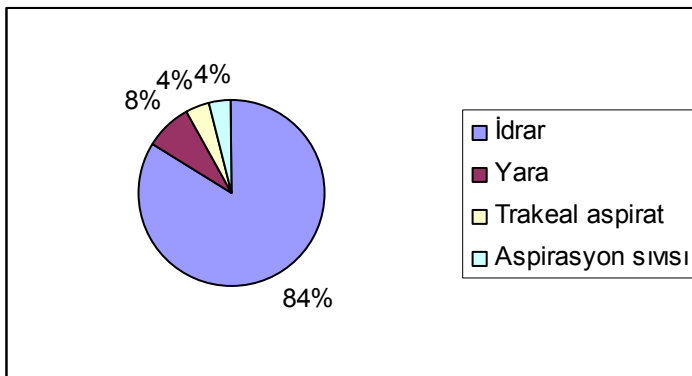
<i>Klebsiella</i> türleri	Klinik örnekler						Toplam
	İdrar	Yara	Kan	balgam	Trakeal aspirat	Aspirasyon sıvısı	
<i>K. pneumoniae</i>	86	7	5	3	2	-	103
<i>K. oxytoca</i>	21	2	-	-	1	1	25
Total	107	9	5	3	3	1	128



Şekil 4.1. 128 Hasta materyalinin *Klebsiella* türlerine göre dağılımı



Şekil 4.2. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı



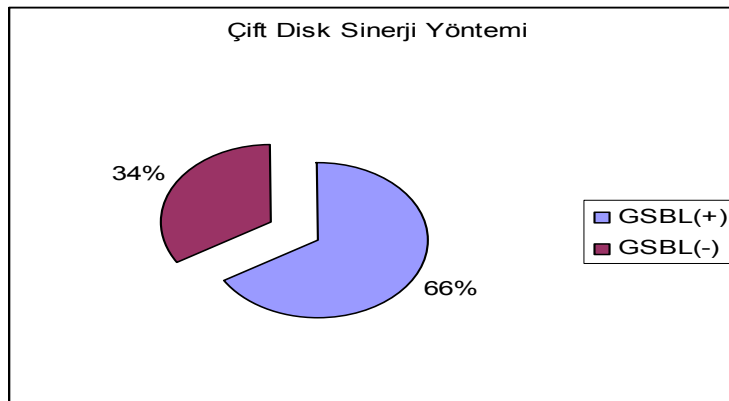
Şekil 4.3. 25 *K. oxytoca* bakterisinin hasta materyallerine göre % dağılımı

128 *Klebsiella* bakterisinde GSBL enzim varlığı 2 farklı yöntemle çalışılmıştır. Birinci yöntemde fenotipik olarak çift disk sinerji testi ve klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı yöntemi ile GSBL varlığı belirlenmiştir. Çift disk sinerji testinde amoksisilin/klavulonikasit aztreonam, seftazidim, seftriakson ve sefotaksim antibiyotikleri kullanılmıştır. Bu antibiyotiklerle yapılan ÇDST'ine göre 128 *Klebsiella* bakterisinin 85 (%66,40)'inde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi varlığı tespit edilirken 43 (%33,59)'ünde bu enzim saptanamamıştır. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4'de GSBL enzimi üreten 128 *Klebsiella* bakterisinin dağılımı gösterilmiştir. Çift disk sinerji yöntemine göre 103 *K. pneumoniae* izolatının 71 (%69)'inde GSBL tespit edilirken 32 (%31)'sinde bu enzim belirlenememiştir (Şekil 4.5). Aynı şekilde isimlendirmesi yapılan 25 *K. oxytoca* bakterisinin 14 (%56)'ünde GSBL tespit edilirken 11 (%44)'inde belirlenememiştir (Şekil 4.6).

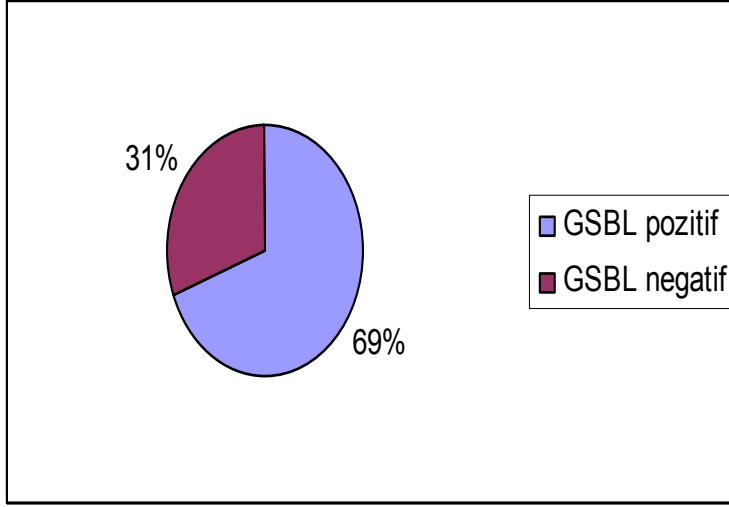
Çizelge 4.2. Çift disk sinerji yöntemine göre GSBL üreten *Klebsiella* bakterilerinin dağılımı

<i>Klebsiella</i> türleri	GSBL enzimi üreten ve üretmeyen suşların sayısı		Toplam
	GSBL (+)	GSBL (-)	
<i>K. pneumoniae</i>	71	32	103
<i>K. oxytoca</i>	14	11	25
Toplam	85	43	128

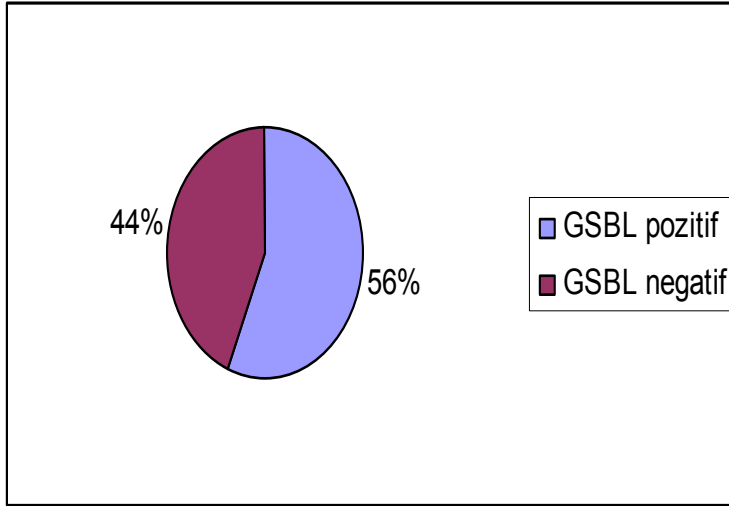
GSBL (+): Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi pozitif
 GSBL (-): Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi negatif



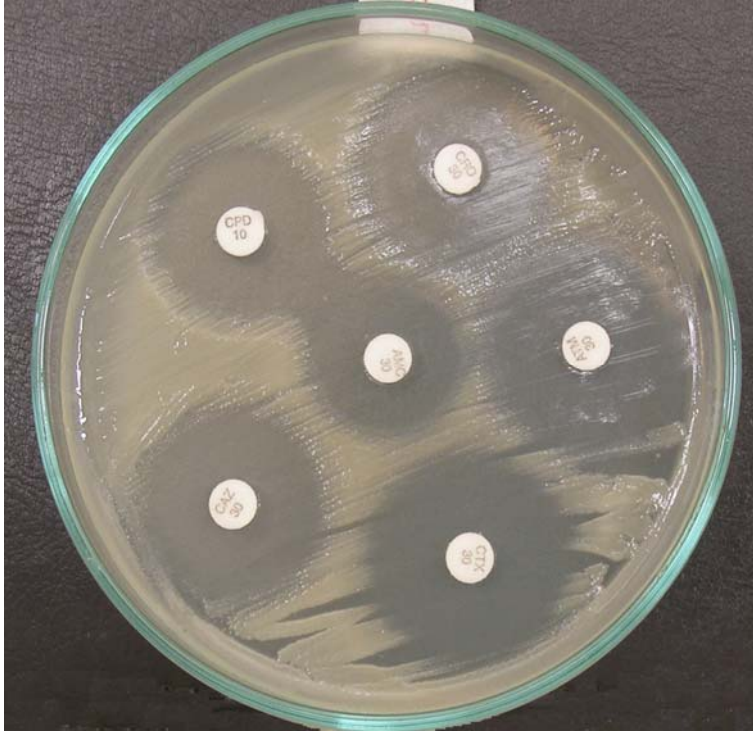
Şekil 4.4. Çift disk sinerji testi ile GSBL enzimi üreten *Klebsiella* bakterilerinin yüzde dağılımı



Şekil 4.5. ÇDST ile GSBL üreten *K. pneumoniae* bakterilerinin % dağılımı



Şekil 4.6.ÇDST ile GSBL üreten *K. oxytoca* bakterilerinin % dağılımı



Resim 4.1. ÇDST ile GSBL pozitif *Klebsiella* bakterisinin görünümü

128 *Klebsiella* bakterisinin GSBL sonuçları Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. 128 *Klebsiella* bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları

İzolat No	<i>Klebsiella</i> türleri	GSBL
1	<i>K.pneumoniae</i>	+
2	<i>K.pneumoniae</i>	+
3	<i>K. oxytoca</i>	-
4	<i>K.pneumoniae</i>	+
5	<i>K.pneumoniae</i>	+
6	<i>K.pneumoniae</i>	+
7	<i>K. oxytoca</i>	+
8	<i>K.pneumoniae</i>	-
9	<i>K. oxytoca</i>	+
10	<i>K.pneumoniae</i>	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	-
12	<i>K.pneumoniae</i>	+
13	<i>K.pneumoniae</i>	-
14	<i>K.pneumoniae</i>	-

Çizelge 4.3. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları

15	<i>K.pneumoniae</i>	-
16	<i>K.pneumoniae</i>	+
17	<i>K.pneumoniae</i>	+
18	<i>K. oxytoca</i>	-
19	<i>K. oxytoca</i>	-
20	<i>K.pneumoniae</i>	+
21	<i>K. oxytoca</i>	+
22	<i>K. oxytoca</i>	+
23	<i>K.pneumoniae</i>	-
24	<i>K. oxytoca</i>	+
25	<i>K.pneumoniae</i>	+
26	<i>K.pneumoniae</i>	+
27	<i>K.pneumoniae</i>	+
28	<i>K. oxytoca</i>	+
29	<i>K.pneumoniae</i>	+
30	<i>K.pneumoniae</i>	+
31	<i>K.pneumoniae</i>	-
32	<i>K.pneumoniae</i>	+
33	<i>K. oxytoca</i>	-
34	<i>K.pneumoniae</i>	-
35	<i>K. oxytoca</i>	-
36	<i>K.pneumoniae</i>	+
37	<i>K.pneumoniae</i>	+
38	<i>K.pneumoniae</i>	+
39	<i>K.pneumoniae</i>	-
40	<i>K.pneumoniae</i>	-
41	<i>K.pneumoniae</i>	+
42	<i>K.pneumoniae</i>	-
43	<i>K.pneumoniae</i>	+
44	<i>K. oxytoca</i>	+
45	<i>K.pneumoniae</i>	-
46	<i>K. oxytoca</i>	+
47	<i>K.pneumoniae</i>	-
48	<i>K. oxytoca</i>	+

Çizelge 4.3. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları

49	<i>K.pneumoniae</i>	+
50	<i>K.pneumoniae</i>	+
51	<i>K.pneumoniae</i>	+
52	<i>K.pneumoniae</i>	+
53	<i>K.pneumoniae</i>	+
54	<i>K. oxytoca</i>	+
55	<i>K.pneumoniae</i>	+
56	<i>K.pneumoniae</i>	+
57	<i>K.pneumoniae</i>	+
58	<i>K.pneumoniae</i>	+
59	<i>K.pneumoniae</i>	+
60	<i>K.pneumoniae</i>	+
61	<i>K.pneumoniae</i>	-
62	<i>K.pneumoniae</i>	+
63	<i>K.pneumoniae</i>	+
64	<i>K.pneumoniae</i>	+
65	<i>K.pneumoniae</i>	+
66	<i>K.pneumoniae</i>	+
67	<i>K.pneumoniae</i>	+
68	<i>K.pneumoniae</i>	+
69	<i>K.pneumoniae</i>	+
70	<i>K.pneumoniae</i>	-
71	<i>K.pneumoniae</i>	+
72	<i>K.pneumoniae</i>	+
73	<i>K.pneumoniae</i>	+
74	<i>K.pneumoniae</i>	-
75	<i>K.pneumoniae</i>	+
76	<i>K.pneumoniae</i>	+
77	<i>K.pneumoniae</i>	-
78	<i>K.pneumoniae</i>	+
79	<i>K.pneumoniae</i>	+
80	<i>K.pneumoniae</i>	+
81	<i>K.pneumoniae</i>	+
82	<i>K.pneumoniae</i>	+

Çizelge 4.3. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları

83	<i>K. oxytoca</i>	+
84	<i>K.pneumoniae</i>	+
85	<i>K.pneumoniae</i>	+
86	<i>K.pneumoniae</i>	+
87	<i>K.pneumoniae</i>	+
88	<i>K. oxytoca</i>	-
89	<i>K.pneumoniae</i>	+
90	<i>K.pneumoniae</i>	+
91	<i>K.pneumoniae</i>	+
92	<i>K. oxytoca</i>	+
93	<i>K.pneumoniae</i>	+
94	<i>K.pneumoniae</i>	+
95	<i>K.pneumoniae</i>	+
96	<i>K.pneumoniae</i>	+
97	<i>K.pneumoniae</i>	-
98	<i>K.pneumoniae</i>	+
99	<i>K.pneumoniae</i>	-
100	<i>K. oxytoca</i>	-
101	<i>K. oxytoca</i>	-
102	<i>K.pneumoniae</i>	+
103	<i>K. oxytoca</i>	-
104	<i>K.pneumoniae</i>	+
105	<i>K.pneumoniae</i>	-
106	<i>K.pneumoniae</i>	-
107	<i>K.pneumoniae</i>	-
108	<i>K.pneumoniae</i>	-
109	<i>K.pneumoniae</i>	-
110	<i>K. oxytoca</i>	+
111	<i>K.pneumoniae</i>	+
112	<i>K.pneumoniae</i>	-
113	<i>K. oxytoca</i>	-
114	<i>K.pneumoniae</i>	-
115	<i>K.pneumoniae</i>	+
116	<i>K.pneumoniae</i>	-

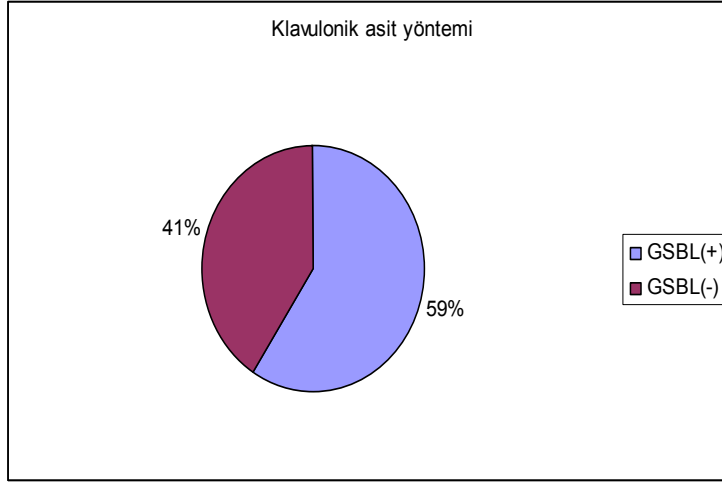
Çizelge 4.3. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinin ÇDST'ine göre GSBL sonuçları

117	<i>K.pneumoniae</i>	+
118	<i>K.pneumoniae</i>	-
119	<i>K.pneumoniae</i>	+
120	<i>K. oxytoca</i>	+
121	<i>K.pneumoniae</i>	-
122	<i>K.pneumoniae</i>	-
123	<i>K.pneumoniae</i>	-
124	<i>K.pneumoniae</i>	+
125	<i>K.pneumoniae</i>	-
126	<i>K.pneumoniae</i>	+
127	<i>K.pneumoniae</i>	+
128	<i>K. oxytoca</i>	-

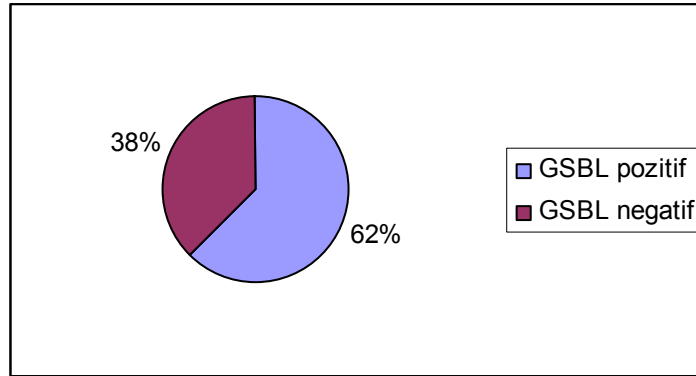
Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemine göre GSBL varlığı tespitinde 128 *Klebsiella* bakterisinin 76 (%59,37)'sında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi varlığı tespit edilirken 52 (%40,62)'sinde bu enzim saptanamamıştır. Çizelge 4.4'de Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı ile GSBL enzimi üreten 128 *Klebsiella* bakterisinin tür dağılımı, Şekil 4.7'de ise klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı ile GSBL enzimi üreten 128 *Klebsiella* bakterisinin % dağılımı gösterilmiştir. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı ile 103 *K. pneumoniae* izolatının 64 (%62)'ünde GSBL tespit edilirken 39 (%38)'unda bu enzim belirlenememiştir (Şekil 4.8). 25 *K. oxytoca* bakterisinin 12 (%48)'sinde GSBL tespit edilirken 13 (%52)'ünde belirlenememiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.4. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL üreten *Klebsiella* bakterileri

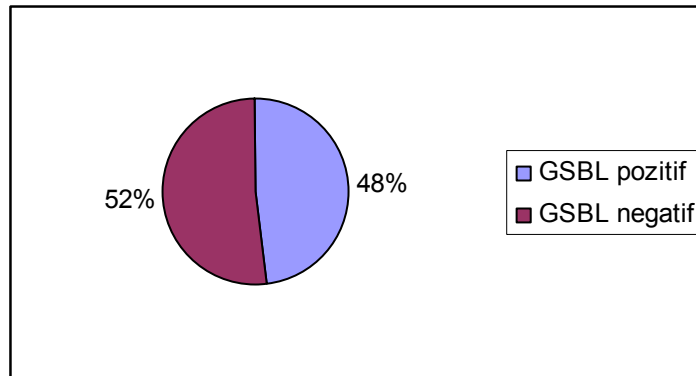
<i>Klebsiella</i> türleri	GSBL üreten ve üretmeyen suşların sayısı		Toplam
	GSBL (+)	GSBL (-)	
<i>K. pneumoniae</i>	64	39	103
<i>K. oxytoca</i>	12	13	25
Toplam	76	52	128



Şekil 4.7. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanım yöntemine göre GSBL üreten *Klebsiella* bakterilerinin % dağılımı



Şekil 4.8. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı ile GSBL üreten *K. pneumoniae* bakterilerinin % dağılımı



Şekil 4.9. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı ile GSBL üreten *K. oxytoca* bakterilerinin % dağılımı



Resim 4.2. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemi ile GSBL pozitif *Klebsiella* bakterisinin görünümü

Çizelge 4.5’de 128 *Klebsiella* bakterisinin klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotik disklerinin zon çapları ve GSBL sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları

İzolat No	<i>Klebsiella</i> türleri	CAZ(mm)	CAZ/CLA (mm)	CTX (mm)	CTX/CLA (mm)	GSBL
1	<i>K.pneumoniae</i>	10	12	4	20	+
2	<i>K.pneumoniae</i>	14	16	10	10	-
3	<i>K. oxytoca</i>	20	20	16	16	-
4	<i>K.pneumoniae</i>	12	12	13	13	-
5	<i>K.pneumoniae</i>	8	20	6	22	+
6	<i>K.pneumoniae</i>	14	14	23	28	+
7	<i>K. oxytoca</i>	10	10	20	20	-
8	<i>K.pneumoniae</i>	20	22	22	24	-

Çizelge 4.5. (Devam) Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları

9	<i>K. oxytoca</i>	13	13	4	4	-
10	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	-	20	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	20	24	24	25	-
12	<i>K.pneumoniae</i>	10	18	10	16	+
13	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	24	24	-
14	<i>K.pneumoniae</i>	22	22	24	24	-
15	<i>K.pneumoniae</i>	16	16	25	25	-
16	<i>K.pneumoniae</i>	20	28	24	28	+
17	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	25	25	-
18	<i>K. oxytoca</i>	20	20	16	16	-
19	<i>K. oxytoca</i>	19	19	27	27	-
20	<i>K.pneumoniae</i>	24	24	12	16	-
21	<i>K. oxytoca</i>	10	15	20	25	+
22	<i>K. oxytoca</i>	14	20	4	20	+
23	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	24	24	-
24	<i>K. oxytoca</i>	6	16	-	21	+
25	<i>K.pneumoniae</i>	10	14	10	16	+
26	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	20	22	+
27	<i>K.pneumoniae</i>	-	8	-	8	+
28	<i>K. oxytoca</i>	10	20	10	20	+
29	<i>K.pneumoniae</i>	4	22	14	22	+
30	<i>K.pneumoniae</i>	2	16	6	20	+
31	<i>K.pneumoniae</i>	11	11	10	11	-
32	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	14	20	+
33	<i>K. oxytoca</i>	17	20	20	20	-
34	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	23	23	-
35	<i>K. oxytoca</i>	24	24	30	30	-
36	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	13	13	+
37	<i>K.pneumoniae</i>	14	20	6	22	+
38	<i>K.pneumoniae</i>	-	20	-	20	+
39	<i>K.pneumoniae</i>	6	6	16	16	-
40	<i>K.pneumoniae</i>	7	10	3	7	-
41	<i>K.pneumoniae</i>	22	24	28	34	+

Çizelge 4.5. (Devam) Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları

42	<i>K.pneumoniae</i>	17	18	16	18	-
43	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	20	22	+
44	<i>K. oxytoca</i>	16	30	12	30	+
45	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	23	23	-
46	<i>K. oxytoca</i>	12	22	10	20	+
47	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	22	22	-
48	<i>K. oxytoca</i>	10	22	10	20	+
49	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	4	20	+
50	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	14	26	+
51	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	10	20	+
52	<i>K.pneumoniae</i>	8	20	10	16	+
53	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	20	22	+
54	<i>K. oxytoca</i>	16	24	12	24	+
55	<i>K.pneumoniae</i>	-	20	-	18	+
56	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	12	20	+
57	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	14	22	+
58	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	13	14	+
59	<i>K.pneumoniae</i>	12	18	12	20	+
60	<i>K.pneumoniae</i>	10	10	12	14	-
61	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	22	22	-
62	<i>K.pneumoniae</i>	14	18	20	21	-
63	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	12	20	+
64	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	6	14	+
65	<i>K.pneumoniae</i>	10	18	4	20	+
66	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	12	20	+
67	<i>K.pneumoniae</i>	2	22	2	22	+
68	<i>K.pneumoniae</i>	-	20	-	20	+
69	<i>K.pneumoniae</i>	18	22	24	30	+
70	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	24	24	-
71	<i>K.pneumoniae</i>	16	22	20	26	+
72	<i>K.pneumoniae</i>	8	18	4	12	+
73	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	4	22	+
74	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	20	20	-

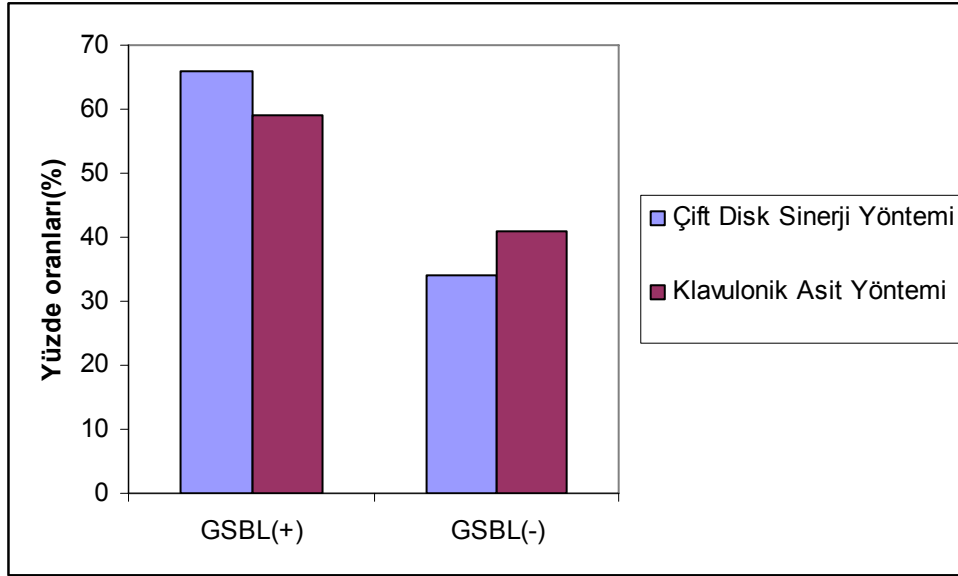
Çizelge 4.5. (Devam) Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları

75	<i>K.pneumoniae</i>	6	18	2	10	+
76	<i>K.pneumoniae</i>	-	16	-	-	+
77	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	23	23	-
78	<i>K.pneumoniae</i>	22	24	18	18	+
79	<i>K.pneumoniae</i>	12	20	20	20	+
80	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	14	16	+
81	<i>K.pneumoniae</i>	10	22	14	20	+
82	<i>K.pneumoniae</i>	13	20	10	16	+
83	<i>K. oxytoca</i>	14	22	14	22	+
84	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	14	24	+
85	<i>K.pneumoniae</i>	10	22	10	18	+
86	<i>K.pneumoniae</i>	14	18	10	14	-
87	<i>K.pneumoniae</i>	12	12	12	18	+
88	<i>K. oxytoca</i>	19	20	20	20	-
89	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	20	20	+
90	<i>K.pneumoniae</i>	14	22	14	20	+
91	<i>K.pneumoniae</i>	10	20	12	18	+
92	<i>K. oxytoca</i>	24	24	24	30	+
93	<i>K.pneumoniae</i>	8	22	14	24	+
94	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	4	10	+
95	<i>K.pneumoniae</i>	12	12	13	18	+
96	<i>K.pneumoniae</i>	11	20	13	24	+
97	<i>K.pneumoniae</i>	20	24	20	23	-
98	<i>K.pneumoniae</i>	6	18	12	20	+
99	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	18	18	-
100	<i>K. oxytoca</i>	18	20	24	24	-
101	<i>K. oxytoca</i>	20	22	24	24	-
102	<i>K.pneumoniae</i>	14	26	22	24	+
103	<i>K. oxytoca</i>	20	20	30	30	-
104	<i>K.pneumoniae</i>	14	18	12	18	+
105	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	24	24	-
106	<i>K.pneumoniae</i>	20	22	24	26	-
107	<i>K.pneumoniae</i>	18	22	20	22	-

Çizelge 4.5. (Devam) Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle GSBL varlığının tespitinde kullanılan antibiyotiklerin zon çapları ve GSBL sonuçları

108	<i>K.pneumoniae</i>	16	18	22	22	-
109	<i>K.pneumoniae</i>	20	22	24	24	-
110	<i>K. oxytoca</i>	12	20	8	22	+
111	<i>K.pneumoniae</i>	-	20	-	22	+
112	<i>K.pneumoniae</i>	20	22	26	26	-
113	<i>K. oxytoca</i>	22	22	24	24	-
114	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	26	26	-
115	<i>K.pneumoniae</i>	14	20	14	28	+
116	<i>K.pneumoniae</i>	16	18	20	20	-
117	<i>K.pneumoniae</i>	4	20	10	22	+
118	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	20	20	-
119	<i>K.pneumoniae</i>	12	22	14	26	+
120	<i>K. oxytoca</i>	6	24	12	24	+
121	<i>K.pneumoniae</i>	20	20	24	26	-
122	<i>K.pneumoniae</i>	20	24	26	26	-
123	<i>K.pneumoniae</i>	19	20	24	24	-
124	<i>K.pneumoniae</i>	13	22	14	20	+
125	<i>K.pneumoniae</i>	18	20	24	24	-
126	<i>K.pneumoniae</i>	12	24	14	24	+
127	<i>K.pneumoniae</i>	17	24	14	26	+
128	<i>K. oxytoca</i>	28	28	28	32	-

GSBL varlığının tespitinde kullanılan ÇDTS ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yönteminin yüzde karşılaştırılması Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. 128 *Klebsiella* bakterisinde Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemi ve ÇDST ile belirlenen GSBL yüzdelerinin karşılaştırılması

ÇDST ile 103 *K. pneumoniae* bakterisinin 71 (%69), 25 *K. oxytoca* bakterisinin 14 (%56)'ünde GSBL belirlenirken, klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemi ile 103 *K. pneumoniae* bakterisinin 64 (%62,13), 25 *K. oxytoca* bakterisinin 12 (%48)'sinde GSBL tespit edilmiştir. Klavulonik asit kombinasyonu ve Çift disk sinerji yöntemine göre GSBL üreten *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* türlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı ve ÇDST'ine göre GSBL üreten *Klebsiella* bakterilerinin karşılaştırılması

<i>Klebsiella</i> türleri	GSBL enzimi üreten suşların sayısı			
	GSBL (+)		GSBL (-)	
	ÇDTS	Klavulonik asit yöntemi	ÇDTS	Klavulonik asit yöntemi
<i>K. pneumoniae</i>	71 (%68,93)	64 (62,13)	32 (31,06)	39 (37,86)
<i>K. oxytoca</i>	14 (56)	12 (48)	11 (44)	13 (52)
Toplam	85	76	43	52

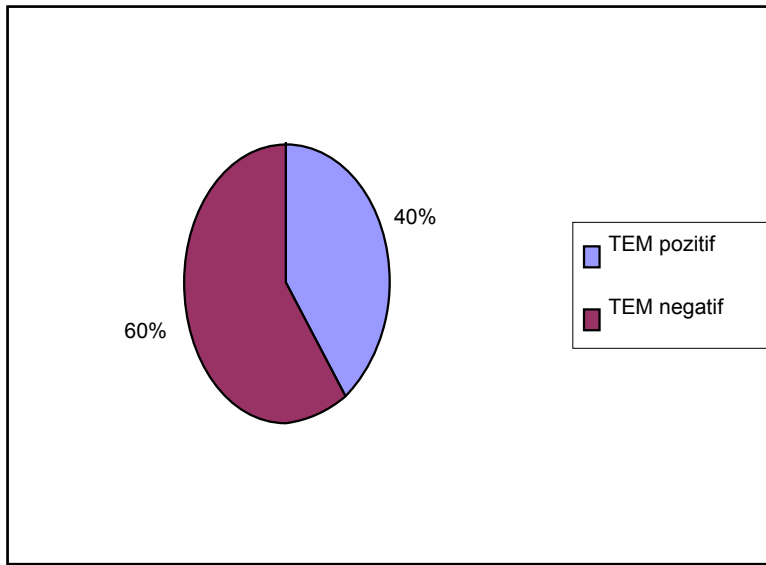
Araştırmada 128 *Klebsiella* bakterisinin GSBL varlığının belirlenmesinde fenotipik yöntemler olarak Çift disk sinerji yöntemi ile Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemleri çalışılmıştır. Çift disk sinerji testi (ÇDST) ile %66 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle *Klebsiella* şuşlarının %59,37'sinin GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir. Çift disk sinerji yöntemi ve klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemlerinin kıyaslanmasında kullanılan t testi sonuçları, bu iki yöntem arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Araştırmada 2 farklı metotla 128 *Klebsiella* bakterisinde GSBL varlığı belirlenmiştir. Birinci metotda fenotipik yöntemlerle GSBL enzimi belirlendikten sonra ikinci metotumuz olan genotipik yöntemlerle de (PZR-RFLP) yine GSBL enzim varlığı araştırılmıştır. Genotipik yöntem için spesifik TEM ve SHV primerleri ile çalışılmıştır. 128 *Klebsiella* bakterisi PZR yöntemiyle TEM ve SHV primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jeller hazırlanarak yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapılmıştır.

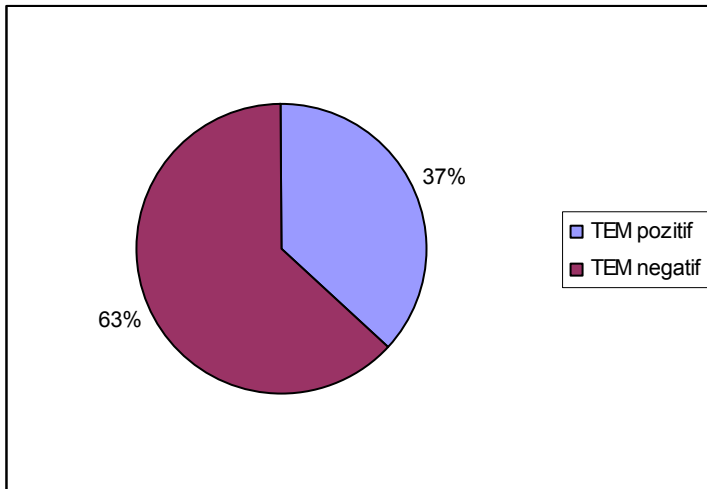
PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi sonucu *Klebsiella* bakterilerinde tür dağılımına bakıldığında 38 *K. pneumoniae* bakterisinde TEM tip, 66 *K. pneumoniae* bakterisinde SHV tip GSBL tespit edilmiştir. 13 *K. oxytoca* bakterisinde TEM tip, 6 *K. oxytoca* bakterisinde SHV tip GSBL belirlenmiştir. PZR çalışması sonucu elde SHV ve TEM tip GSBL taşıyan *Klebsiella* türleri Çizelge 4.7'de; % dağılımları ise, Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.7 PZR çalışması sonucu SHV ve TEM tip GSBL taşıyan *Klebsiella* bakterileri

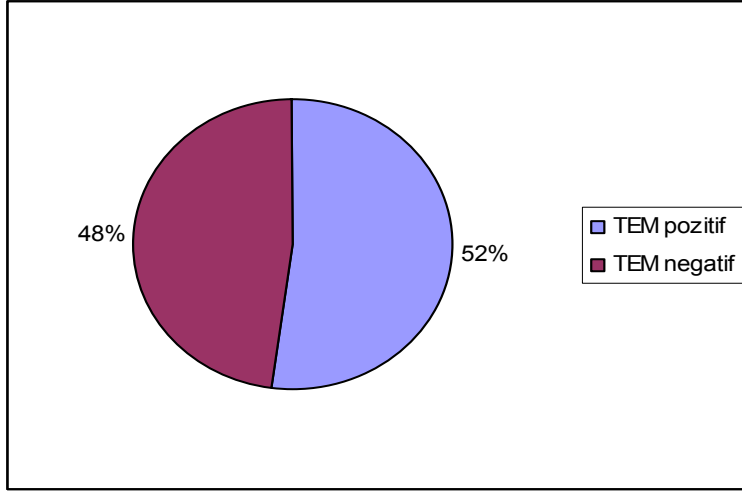
<i>Klebsiella</i> bakterileri	blaTEM	blaSHV
<i>K. pneumoniae</i>	38	66
<i>K. oxytoca</i>	13	6
Toplam	51	72



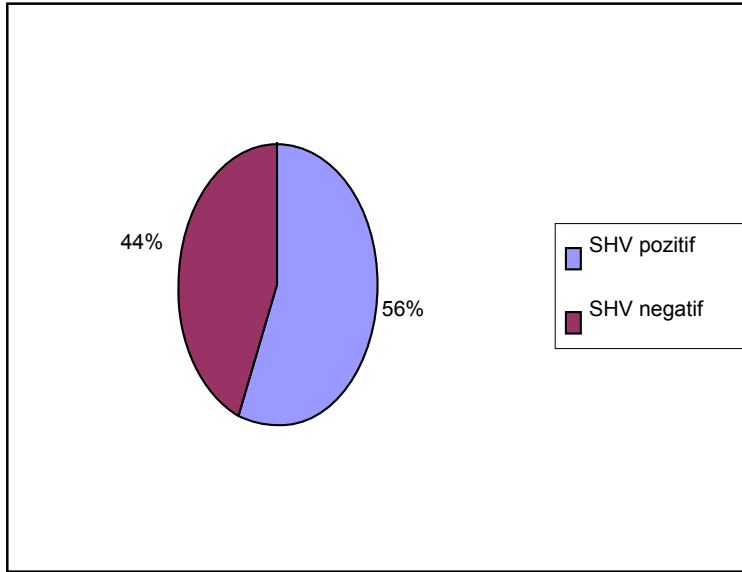
Şekil 4.11. 128 *Klebsiella* bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı



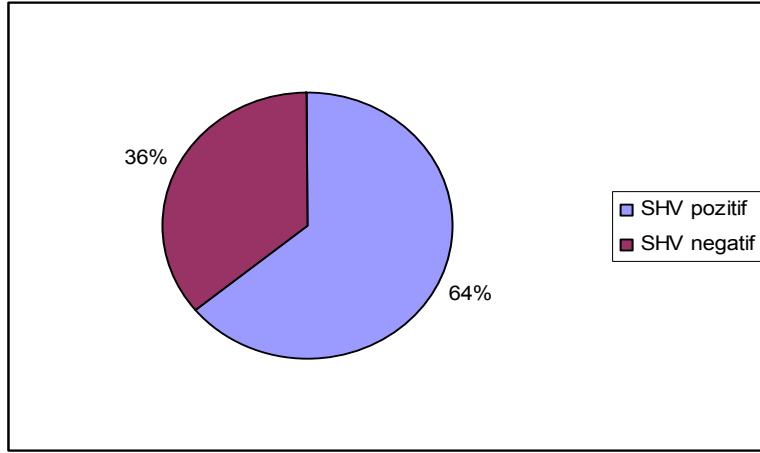
Şekil 4.12. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı



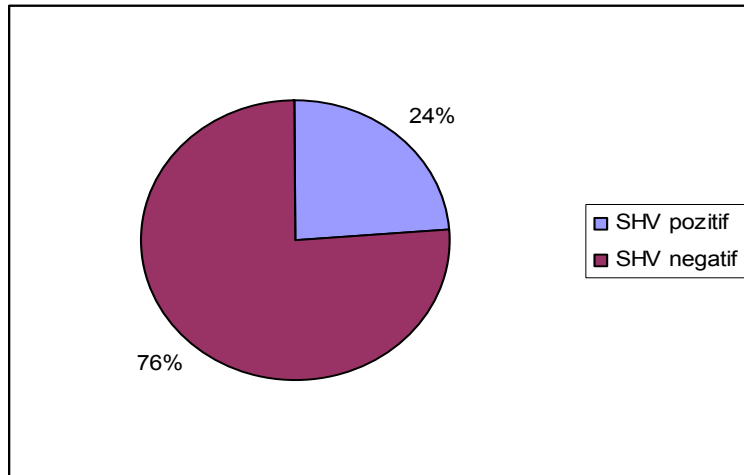
Şekil 4.13. 25 *K. oxytoca* bakterisinin TEM tip GSBL taşımasına göre % dağılımı



Şekil 4.14. 128 *Klebsiella* bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı



Şekil 4.15. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı



Şekil 4.16. 25 *K. oxytoca* bakterisinin SHV tip GSBL taşımasına göre % dağılımı

PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi sonucu 128 *Klebsiella* bakterisinin 72'sinde SHV primeri ile 293 bp'lık bant oluşumu, 51'inde TEM primeri ile 966 bp'lık bant oluşumu gözlenmiştir. PZR çalışması sonucu elde SHV ve TEM tip GSBL taşıyan *Klebsiella* türleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 23 *K. pneumoniae* ve 4 *K. oxytoca* bakterisinde hem ÇDST yöntemiyle hem de TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı belirlenmiştir. 6 *K. pneumoniae* ve 3 *K. oxytoca* bakterisinde sadece ÇDST

yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı tespit edilmiştir. 15 *K. pneumoniae* ve 4 *K. oxytoca* bakterisinde ise ÇDST yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi belirlenemezken TEM ve/veya SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı belirlenmiştir. 30 *K. pneumoniae* ve 1 *K. oxytoca* bakterisinde ÇDST yöntemiyle ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında, 12 *K. pneumoniae* ve 6 *K. oxytoca* bakterisinde ÇDST yöntemiyle ve TEM primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı tespit edilmiştir. (Çizelge 4.8). Resim 4.3 ve Resim 4.4’de TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmalarının agaroz jel elektroforezdaki görüntüsü verilmiştir.

Çizelge 4.8.103 *K. pneumoniae* ve 25 *K. oxytoca* bakterisinin TEM, SHV ve ÇDST sonuçlarının karşılaştırılması

<i>Klebsiella</i> bakterileri	blaTEM	blaSHV	ÇDST	Toplam
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	23
	-	+	+	30
	-	-	+	6
	+	-	+	12
	+	-	-	2
	-	+	-	12
	+	+	-	1
	-	-	-	17
<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	4
	-	+	+	1
	-	-	+	3
	+	-	+	6
	+	-	-	3
	-	+	-	1
	+	+	-	0
	-	-	-	7
Toplam				128

Çizelge 4.9'da ise 128 *Klebsiella* bakterisinde TEM primeri, SHV primeri, ÇDST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle tespit edilen GSBL sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.9. 128 *Klebsiella* bakterisinde farklı yöntemlerle (seçilen primerlerle, ÇDST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle) tespit edilen GSBL varlığı

İzolat No	<i>Klebsiella</i> bakterileri	blaTEM	blaSHV	ÇDST	Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle
1	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
2	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
3	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
4	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
5	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
6	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
7	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	-
8	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
9	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	-
10	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
12	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
13	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	-	-
14	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
15	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
16	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
17	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
18	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
19	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
20	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
21	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	+
22	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
23	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
24	<i>K. oxytoca</i>	-	+	+	+
25	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
26	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
27	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
28	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	+
29	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+

Çizelge 4.9. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde farklı yöntemlerle (seçilen primerlerle, ÇDST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle) tespit edilen GSBL varlığı.

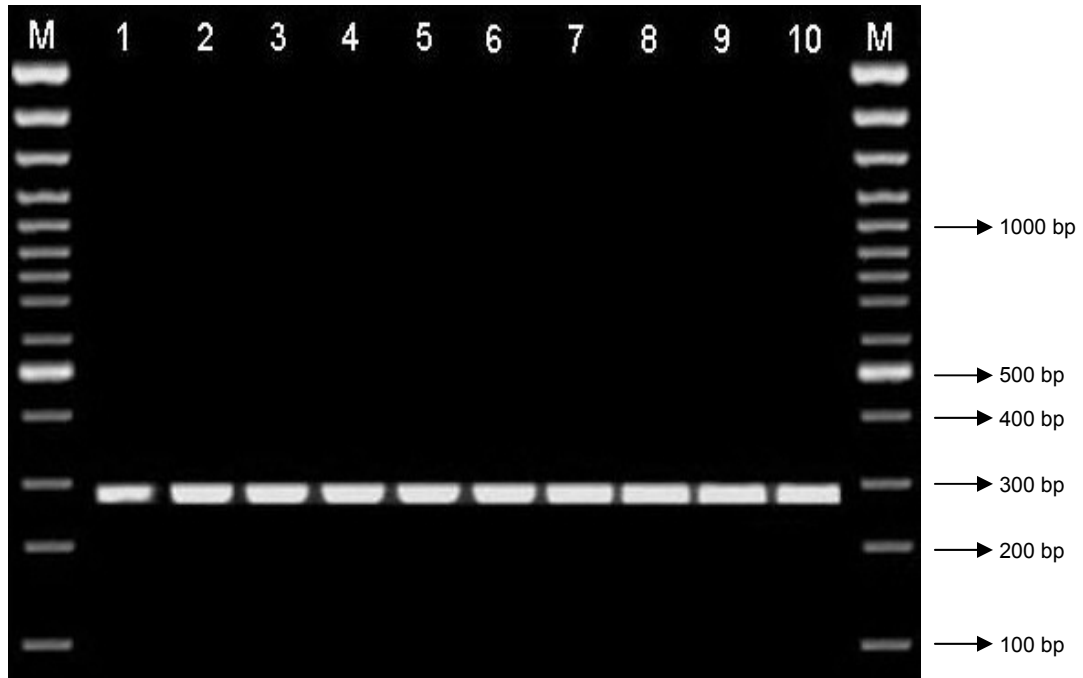
30	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
31	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
32	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
33	<i>K. oxytoca</i>	-	+	-	-
34	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
35	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
36	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
37	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
38	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
39	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
40	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
41	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
42	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
43	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
44	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
45	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
46	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	+
47	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
48	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	+
49	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
50	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
51	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
52	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
53	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
54	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
55	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
56	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
57	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
58	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
59	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
60	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
61	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
62	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
63	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
64	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
65	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
66	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+

Çizelge 4.9. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde farklı yöntemlerle (seçilen primerlerle, ÇDST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle) tespit edilen GSBL varlığı

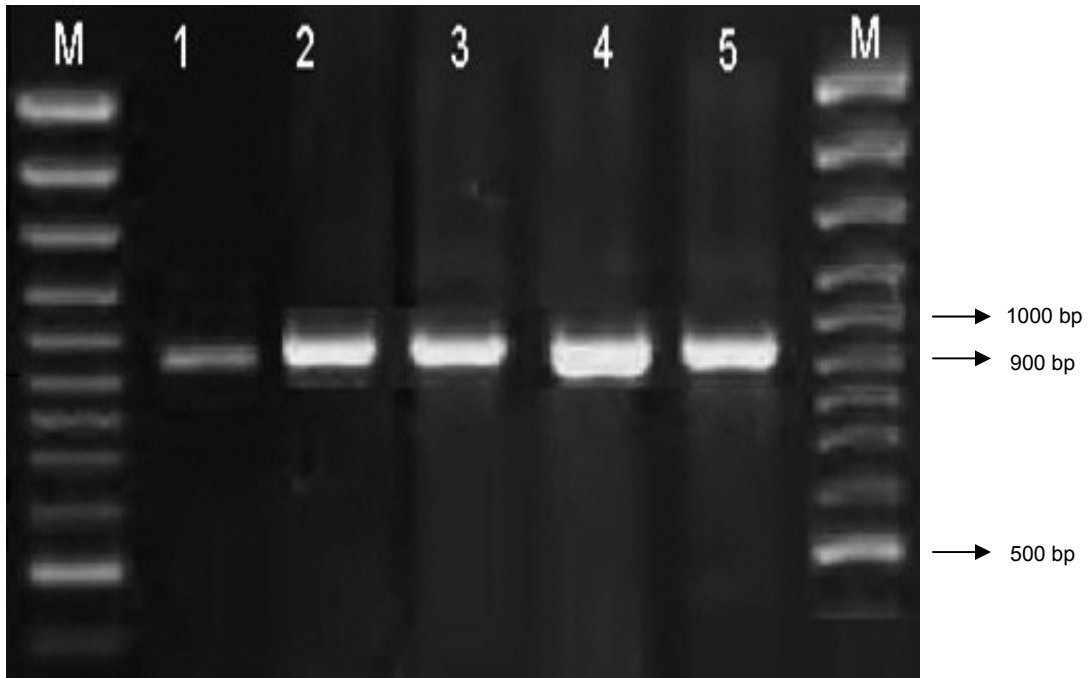
67	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
68	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
69	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
70	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
71	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
72	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
73	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
74	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
75	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
76	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
77	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
78	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
79	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
80	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
81	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
82	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
83	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	+
84	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
85	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
86	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
87	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
88	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
89	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
90	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
91	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
92	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
93	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
94	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
95	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
96	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
97	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
98	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
99	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
100	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	-
101	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
102	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
103	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	-

Çizelge 4.9. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde farklı yöntemlerle (seçilen primerlerle, ÇDST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemiyle) tespit edilen GSBL varlığı

104	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
105	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
106	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
107	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
108	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
109	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
110	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
111	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
112	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
113	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
114	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
115	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
116	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
117	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
118	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	-	-
119	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
120	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+
121	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
122	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
123	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
124	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
125	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	-	-
126	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
127	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
128	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	-



Resim 4.3. SHV sentetik oligonükleotit primeri ile çoğaltılan *Klebsiella* bakterilerinin PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Fermentase SM0321 marker, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp; 1:*K. pneumoniae*; 2:*K. pneumoniae*; 3:*K. oxytoca*; 4:*K. pneumoniae*; 5: *K. oxytoca*; 6:*K. pneumoniae*; 7:*K. pneumoniae*; 8:*K. pneumoniae*; 9:*K. pneumoniae*; 10:*K. pneumoniae*)

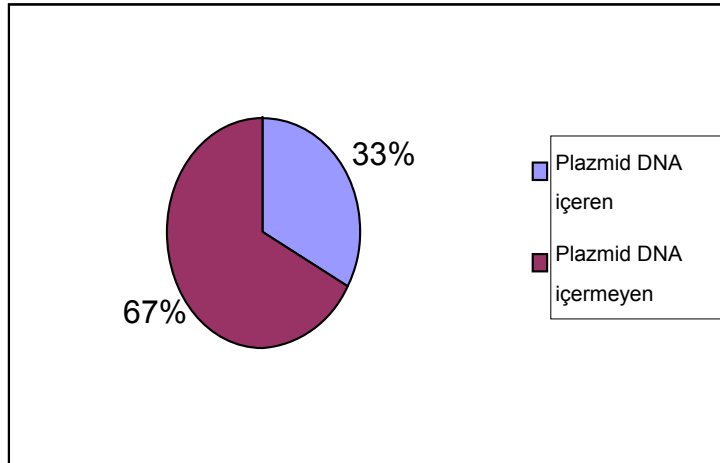


Resim 4.4. TEM sentetik oligonükleotit primeri ile çoğaltılan *Klebsiella* bakterilerinin PZR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Fermentase SM0321 marker, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp; 1:*K. pneumoniae*; 2:*K. pneumoniae*; 3:*K. pneumoniae*; 4:*K. pneumoniae*; 5:*K. pneumoniae*)

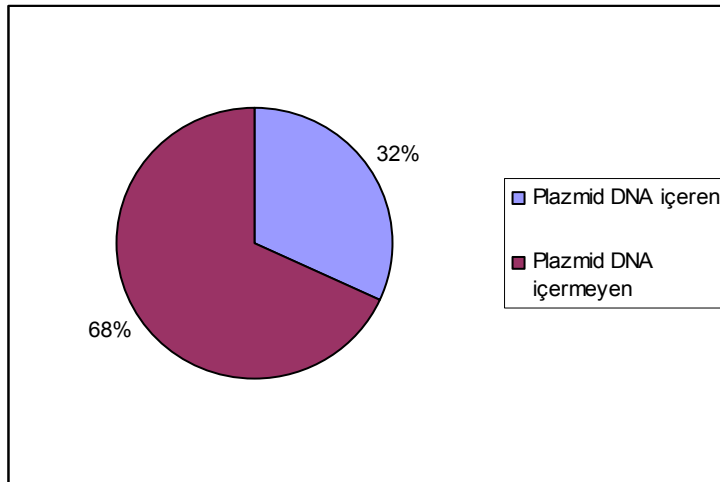
Araştırmada 128 izolatın Plazmid DNA izolasyonu Sambrook'un tanımladığı yöntemle yapılmıştır. Plazmid DNA incelemesinde kullanılan 128 *Klebsiella* bakterisinin 42'sinde 1-10 arasında değişen sayılarda plazmidlere rastlanılmıştır. Bu plazmidlerin moleküler ağırlıklarının 1,375 ve >21,226 kb arasında olduğu belirlenmiştir. 86 *Klebsiella* bakterisinin ise plazmid DNA içermediği gözlenmiştir. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin plazmid profili ele alındığında 33 (%32) *K. pneumoniae* bakterisinin plazmid DNA taşıdığı tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde 25 *K. oxytoca* bakterisinin 9 (%36)'unun plazmid DNA taşıdığı tespit edilmiştir. Tür bazında plazmid DNA dağılımı Çizelge 4.10., Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Plazmid DNA içeren *Klebsiella* bakterilerinin dağılımı

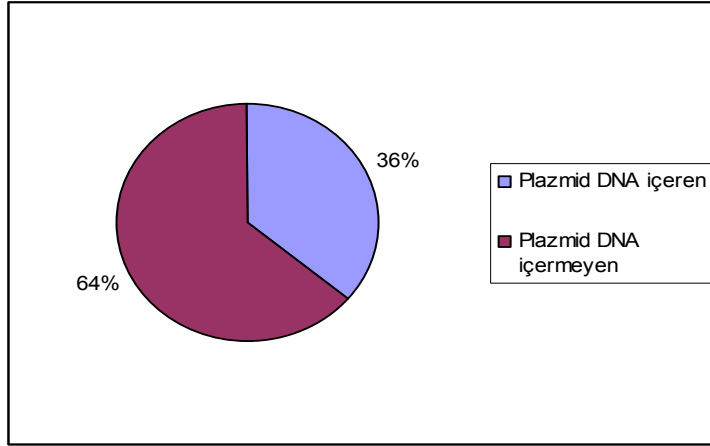
<i>Klebsiella</i> bakterileri	Plazmid DNA içerenler	Plazmid DNA içermeyenler
<i>K.pneumoniae</i>	33	70
<i>K. oxytoca</i>	9	16
Toplam	42	86



Şekil 4.17. 128 *Klebsiella* bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre % dağılımı



Şekil 4.18. 103 *K. pneumoniae* bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre dağılımı



Şekil 4.19. 25 *K. oxytoca* bakterisinin plazmid DNA bulundurmasına göre % dağılımı

Plazmid DNA tespit edilen 42 *Klebsiella* bakterisinin içerdikleri plazmid DNA sayısı ve plazmid büyüklükleri (bp) Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. *Klebsiella* bakterilerinin plazmid DNA profilleri

İzolat no	Tür adı	Plazmid sayısı	Plazmid büyüklükleri(bp)
1	<i>K. oxytoca</i>	1	17300
2	<i>K.pneumoniae</i>	2	3850, 13200
3	<i>K.pneumoniae</i>	3	13200, >21226
4	<i>K.pneumoniae</i>	1	18400
5	<i>K.pneumoniae</i>	3	17300, >21226
6	<i>K.pneumoniae</i>	1	15800
7	<i>K.pneumoniae</i>	1	15800
8	<i>K. oxytoca</i>	1	15800
9	<i>K.pneumoniae</i>	3	17300, 2100, 1700
10	<i>K.pneumoniae</i>	4	17300, 6400, 3200, 2400
11	<i>K.pneumoniae</i>	1	20000
12	<i>K.pneumoniae</i>	3	15800, >21226
13	<i>K.pneumoniae</i>	10	15800, 1375, 1904, 2400, 2850, 9100, 5100, 4600, 3350, >21226
14	<i>K.pneumoniae</i>	5	15800, 7800, 4600, 3200, >21226
15	<i>K.pneumoniae</i>	1	10700
16	<i>K.pneumoniae</i>	1	12600
17	<i>K.pneumoniae</i>	1	8600
18	<i>K.pneumoniae</i>	1	8600
19	<i>K.pneumoniae</i>	4	8600, 5090, 4200, 2700

Çizelge 4.11. (Devam) *Klebsiella* bakterilerinin plazmid DNA profilleri

20	<i>K.pneumoniae</i>	1	8600
21	<i>K.pneumoniae</i>	1	14600
22	<i>K. oxytoca</i>	3	8600,4200, 2950
23	<i>K.pneumoniae</i>	1	12600
24	<i>K. oxytoca</i>	3	8600, 2700, 1375
25	<i>K.pneumoniae</i>	3	10700, 3530, 1750
26	<i>K.pneumoniae</i>	3	14600,4050, 2800
27	<i>K.pneumoniae</i>	1	10700
28	<i>K.pneumoniae</i>	2	14600
29	<i>K.pneumoniae</i>	1	14000
30	<i>K. oxytoca</i>	1	15100
31	<i>K. oxytoca</i>	1	18600
32	<i>K.pneumoniae</i>	1	15100
33	<i>K. oxytoca</i>	1	15100
34	<i>K.pneumoniae</i>	1	15100
35	<i>K.pneumoniae</i>	1	15100
36	<i>K. oxytoca</i>	4	15100, 3530, 2000, >21226
37	<i>K.pneumoniae</i>	1	15100
38	<i>K.pneumoniae</i>	1	17410
39	<i>K.pneumoniae</i>	1	17410
40	<i>K.pneumoniae</i>	3	17410, 4130, >21226
41	<i>K.pneumoniae</i>	1	16300
42	<i>K. oxytoca</i>	4	16500, 3530, 2610, >21226

128 *Klebsiella* bakterisinde ÇDST ve PZR ile tespit edilen GSBL ve Plazmid varlığı Çizelge 4. 12’de verilmiştir. Resim 4.5, 4.6 ve 4.7’de ise 42 *Klebsiella* bakterisinin plazmid profilleri verilmiştir.

Çizelge 4.12. 128 *Klebsiella* bakterisinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve manuel yöntemlerle) ve Plazmid varlığı

İzolat No	<i>Klebsiella</i> türleri	blaTEM	blaSHV	ÇDST	Plazmid varlığı
1	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
2	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
3	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	+
4	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
5	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
6	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-

Çizelge 4.12. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve manuel yöntemlerle) ve Plazmid varlığı.

7	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	-
8	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
9	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	-
10	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
12	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
13	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	-	-
14	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
15	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
16	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
17	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
18	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
19	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
20	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
21	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	-
22	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
23	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
24	<i>K. oxytoca</i>	-	+	+	-
25	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
26	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
27	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
28	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	-
29	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
30	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
31	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
32	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
33	<i>K. oxytoca</i>	-	+	-	+
34	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
35	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-
36	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
37	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
38	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
39	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+
40	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
41	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
42	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+
43	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-

Çizelge 4.12. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve manuel yöntemlerle) ve Plazmid varlığı.

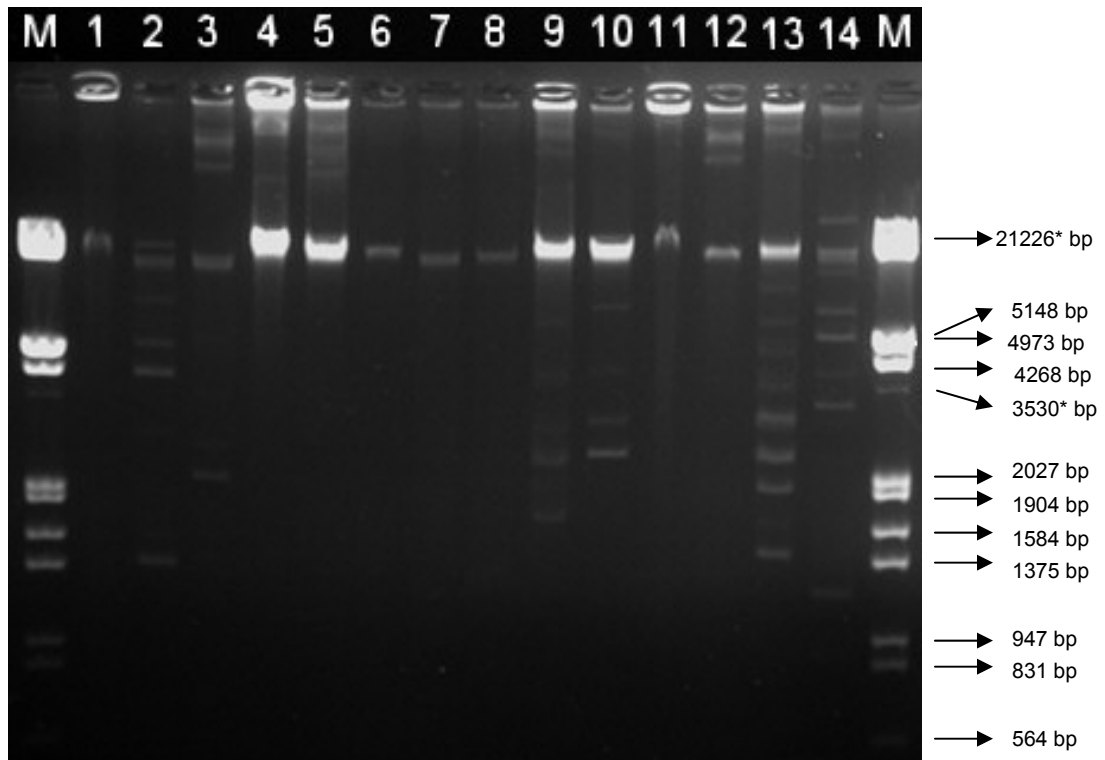
44	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
45	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
46	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	-
47	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+
48	<i>K. oxytoca</i>	-	-	+	-
49	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
50	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
51	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
52	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
53	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
54	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
55	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+
56	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
57	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
58	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
59	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
60	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
61	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
62	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
63	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
64	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
65	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
66	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
67	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
68	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
69	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
70	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+
71	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
72	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
73	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
74	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
75	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
76	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
77	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	-
78	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
79	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
80	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+

Çizelge 4.12. (Devamı) 128 *Klebsiella* bakterisinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve manuel yöntemlerle) ve Plazmid varlığı.

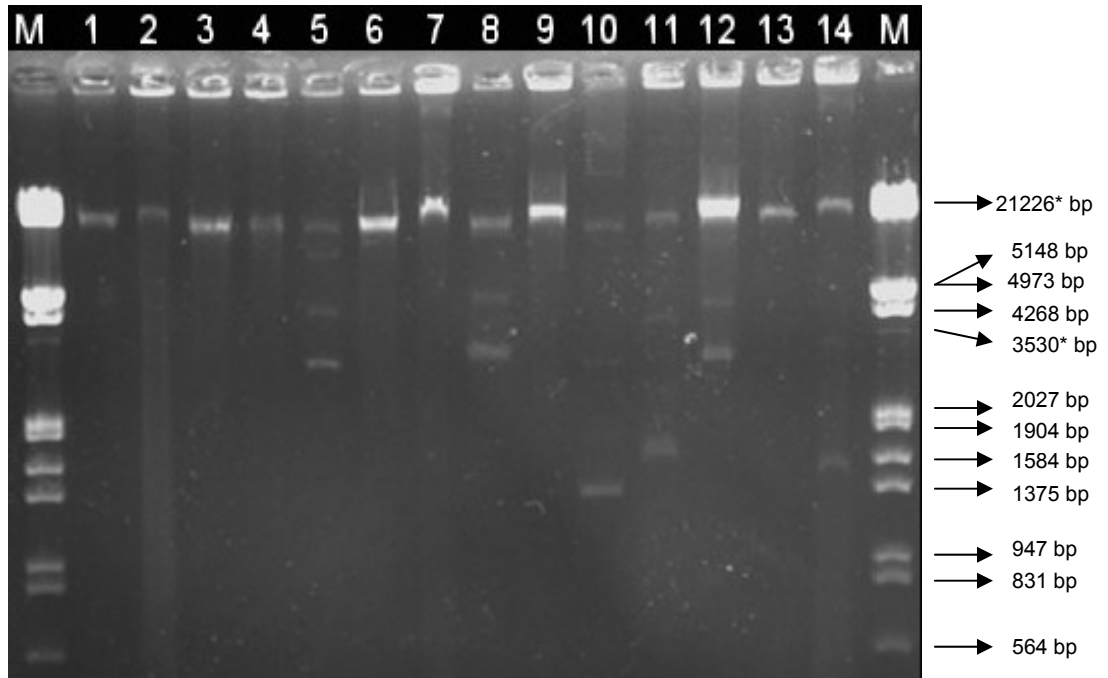
81	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
82	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
83	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	+
84	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
85	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
86	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
87	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
88	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	+
89	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
90	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
91	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	-
92	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
93	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	-
94	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
95	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	+
96	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	+	+
97	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
98	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
99	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
100	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	+
101	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	+
102	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
103	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	+
104	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	-
105	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
106	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
107	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
108	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
109	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
110	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
111	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
112	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
113	<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	+
114	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
115	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
116	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
117	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-

Çizelge 4.12. (Devam) 128 *Klebsiella* bakterisinde tespit edilen GSBL (seçilen primerlerle ve manuel yöntemlerle) ve Plazmid varlığı.

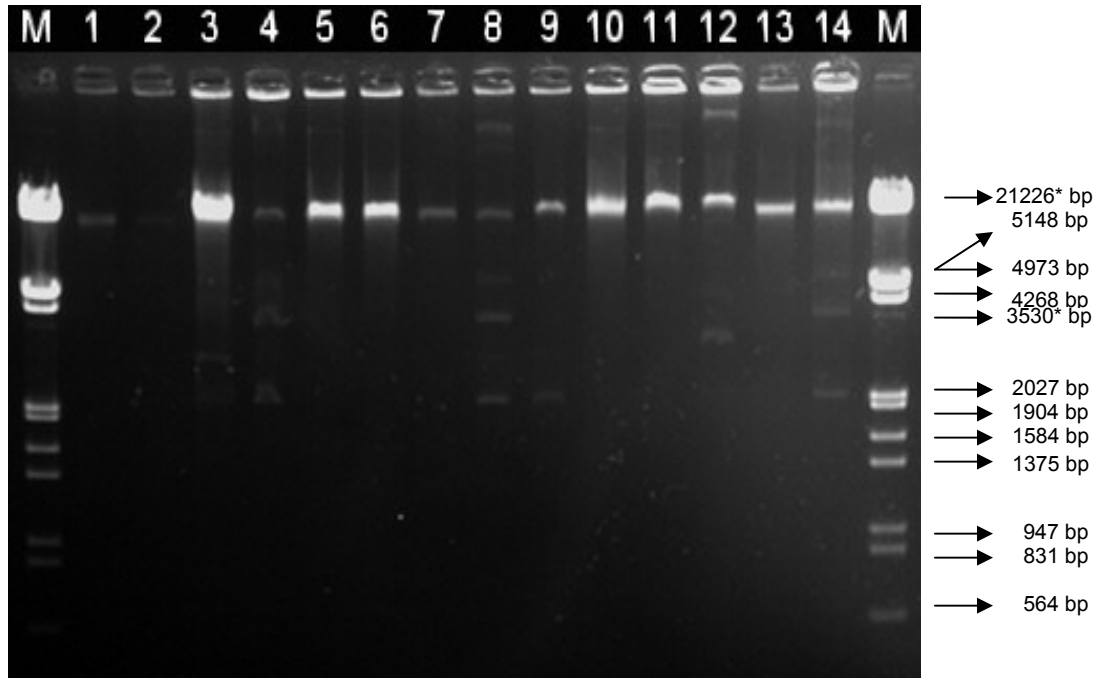
118	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	-	+
119	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
120	<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	-
121	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
122	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	+
123	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
124	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
125	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	-	+
126	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	+
127	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	+	-
128	<i>K. oxytoca</i>	+	-	-	+



Resim 4.5. *Klebsiella* bakterilerinin plazmid profilleri(M: Fermentase SM0191 marker, 21226*, 5148, 4973, 4268, 3530*, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp; 1:*K. oxytoca*; 2:*K. pneumoniae*; 3:*K. pneumoniae*; 4:*K. pneumoniae*; 5:*K. pneumoniae*; 6:*K. pneumoniae*; 7:*K. pneumoniae*; 8:*K. oxytoca*; 9:*K. pneumoniae*; 10:*K. pneumoniae*; 11:*K. pneumoniae*; 12:*K. pneumoniae*; 13:*K. pneumoniae*; 14:*K. pneumoniae*)

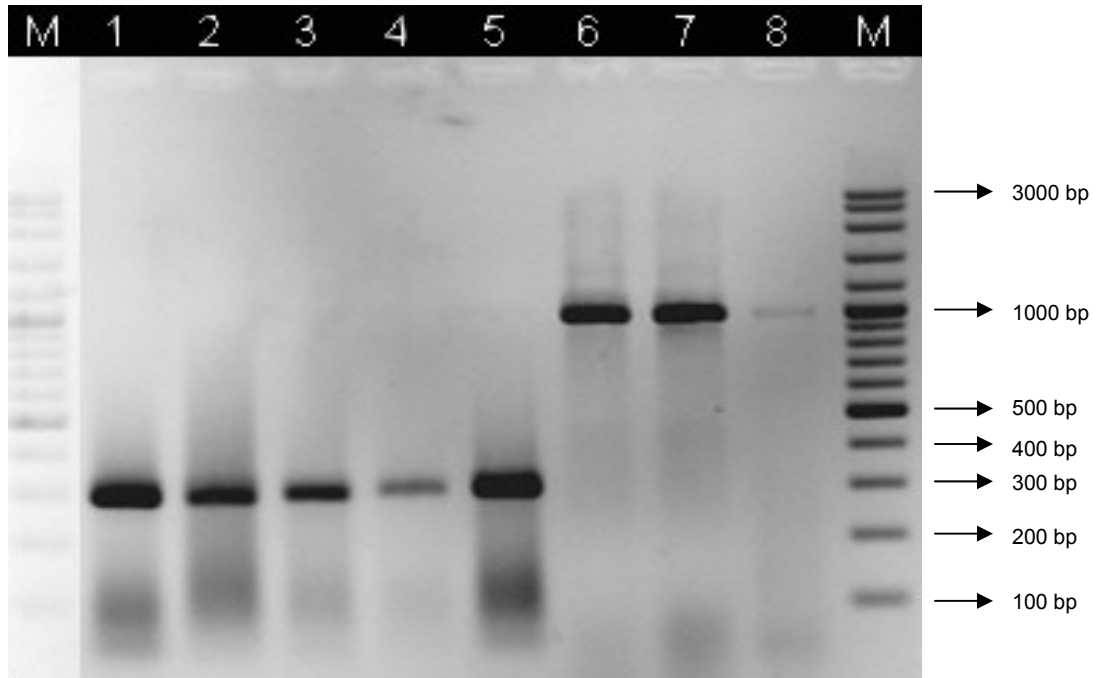


Resim 4.6. *Klebsiella* bakterilerinin plazmid profilleri (M: Fermentase SM0191 marker, 21226*, 5148, 4973, 4268, 3530*, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp; 1:*K. pneumoniae*; 2:*K. pneumoniae*; 3:*K. pneumoniae*; 4:*K. pneumoniae*; 5:*K. pneumoniae*; 6:*K. pneumoniae*; 7:*K. pneumoniae*; 8:*K. oxytoca*; 9:*K. pneumoniae*; 10:*K. oxytoca*; 11:*K. pneumoniae*; 12:*K. pneumoniae*; 13:*K. pneumoniae*; 14:*K. pneumoniae*)

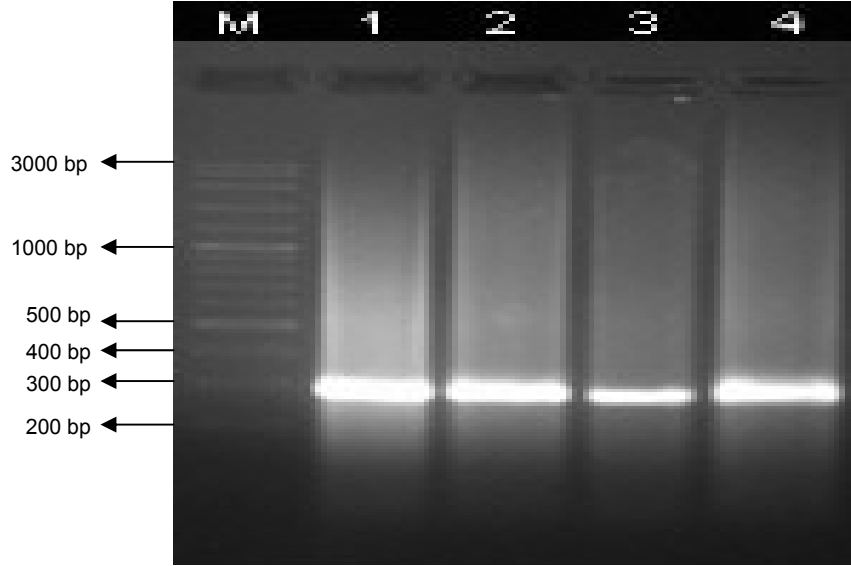


Resim 4.7. *Klebsiella* bakterilerinin plazmid profilleri (M: Fermentase SM0191 marker, 21226*, 5148, 4973, 4268, 3530*, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp; 1:*K. pneumoniae*; 2:*K. oxytoca*; 3:*K. oxytoca*; 4:*K. pneumoniae*; 5:*K. oxytoca*; 6:*K. pneumoniae*; 7:*K. pneumoniae*; 8:*K. oxytoca*; 9:*K. pneumoniae*; 10:*K. oxytoca*; 11:*K. pneumoniae*; 12:*K. pneumoniae*; 13:*K. pneumoniae*; 14:*K. oxytoca*)

PZR de çoğaltılan ürünler *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmiştir. Kesim sonucu oluşan bantların büyüklüğü % 3'lük agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen örnekler 293 baz çiftlik ve 966 baz çiftlik bölgede mutasyon taşımaktadırlar. PZR ile çoğaltılan 51 TEM tip GSBL taşıyan *Klebsiella* bakterileri ile 72 SHV tip GSBL taşıyan *Klebsiella* bakterileri *NheI* enzimi ile kesilmemiştir. PZR'de çoğaltılan ürünlerin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları Resim 4.8 ve Resim 4.9.'da gösterilmiştir.



Resim 4.8. PZR'da çoğaltılan ürünlerin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları (M: Fermentase SM0321 marker, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp; 1-5 SHV ile amplifiye edilen PZR ürünlerinin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları, 1:*K. pneumoniae*; 2:*K. pneumoniae*; 3:*K. pneumoniae*; 4:*K. oxytoca*; 5: *K. oxytoca* 6-8 TEM ile amplifiye edilen PZR ürünlerinin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları, 6:*K. pneumoniae*; 7:*K. pneumoniae*; 8:*K. pneumoniae*)



Resim 4.9. PZR'da çoğaltılan ürünlerin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları (M:Fermentase SM0321 marker, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp; 1:*K. pneumoniae*; SHV ile amplifiye edilen PZR ürününü 2:*K. pneumoniae*; SHV ile amplifiye edilen PZR ürünlerinin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları; 3:*K. pneumoniae*; SHV ile amplifiye edilen PZR ürününü 4:*K. pneumoniae*; SHV ile amplifiye edilen PZR ürünlerinin *NheI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim sonuçları)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, oksiminio sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulonik asit tarafından inhibe olabilen enzimlerdir [Bradford, 2001]. GSBL üreten bakterileri tespit etmek için birçok yöntem ortaya konulmuştur. Bunun için kullanılan testler, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E testi, seftazidim direncine bakma, daha yüksek bakteri yoğunluğunu kullanma, daha dar direnç sınırları uygulanması yanı sıra bunlara göre seyrek başvurulmuş yöntemler olarak da klavulonik asitli besiyerinde disk difüzyon, klavulonik asit kombinasyonlu minimal inhibitör konsantrasyon, klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı ve otomatize Vitek sistemi gibi yöntemlerdir. Ayrıca moleküler düzeyde izoelektrik odaklama, PZR, RAPD, DNA dizi analizi, PZR-RFLP, yöntemleri de bulunmaktadır [Öksüz ve ark., 2008; Taşlı ve Bahar, 2005].

Bu araştırmada *Klebsiella* bakterilerinde GSBL varlığı fenotipik ve genotipik olmak üzere iki farklı yöntemle araştırıldı. Çalışmada kullanılan fenotipik yöntemler; çift disk sinerji testi ve klavulonik asit kombinasyonu içeren disk kullanımı yöntemleridir.

Çalışmada çift disk sinerji yöntemiyle 128 *Klebsiella* bakterisinde %66 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir. Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle 128 *Klebsiella* bakterisinin %59,37'si GSBL (+) pozitifdir.

Ülkemizde ve Dünya'da ÇCST ve Klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemleriyle GSBL sıklığını araştıran yakın zamanda yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

İstanbul'da yapılan bir çalışmada 67 *K. pneumoniae* bakterisinde GSBL varlığı ÇDST'i ile belirlenmiş. 9 (%13,43)'unda GSBL enzimi tespit edilmiştir [Akyıldız ve ark., 1998].

1998 yılında yapılan bir çalışmada 46 *K. pneumoniae* bakterisinde GSBL enzimi ÇDST'i ile çalışılmış, 20 (%43,47)'sinde GSBL varlığı belirlenmiştir [Hoşgör ve ark., 1998].

Yıldız ve ark. 583 enterik bakteride GSBL sıklığını ÇDST yöntemiyle araştırmış ve *K. pneumoniae*'de %39 (43/111) oranında GSBL varlığı bildirmiştir [Yıldız ve ark., 2000].

Çin'de yapılan bir araştırmada 120 *K. pneumoniae* bakterisinin 8 (%6,6)'inde çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif bulunmuştur [Subha ve Ananthan, 2002].

Akçam ve ark. 40 *Klebsiella* bakterisinde GSBL enzimini çift disk sinerji testi (ÇDST) ile araştırmışlar. Sonuçta 14 (%35) *Klebsiella* bakterisinde GSBL üretimi saptanmıştır [Akçam ve ark., 2004].

2004 yılında Manisa'da yapılan bir çalışmada 62 *Klebsiella* bakterisinde GSBL enzimi ÇDST'i ile belirlenmiş. 27 (%43,54)'sinde GSBL varlığı saptanmıştır [Mumcuoğlu ve ark., 2004].

Shukla ve ark. 106 *K. pneumoniae* bakterisinde ÇSDT ile genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi çalışmışlar ve 29 (%27,35) izolatta GSBL olumlu tespit etmişlerdir [Shukla ve ark., 2004].

Vural Ece üniversitemizde yaptığı yüksek lisans tezinde ÇDST yöntemiyle çalışmış ve *Klebsiella* bakterilerinde %34 (34/100) oranında GSBL pozitiflik saptamıştır [Vural Ece, 2005].

Özgüneş ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ÇDST yöntemiyle 100 *K. pneumoniae* suşunda %47 oranında GSBL varlığını saptamışlardır [Özgüneş ve ark., 2006].

2007 yılında Bozkurt ve ark. 14'ü *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere toplam 100 izolatta ÇDST ile Amoksisilin-klavulanat, seftriakson, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam diskleri kullanılarak GSBL aktivitelerini araştırdı. 6 (%42,85) *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde GSBL enzimi tespit edilmiştir [Bozkurt ve ark., 2007].

Yine Türkiye'de yapılan bir çalışmada 41 *K. pneumoniae* bakterisinde ÇDST ile GSBL araştırılmış ve 41 izolatın 33 (%80,48)'ünde GSBL pozitif bulunmuştur [Hoşoğlu ve ark., 2007].

Üniversitemizde 2008 yılında yapılan bir çalışmada 194 *Klebsiella* bakterisinde GSBL varlığı çift disk sinerji testi yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada ÇDST yöntemiyle %65 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir [Akman, 2008].

Hon kong'da yapılan bir çalışmada 8 *K. pneumoniae* bakterisinin 4 (%50)'ünde GSBL çift disk sinerji testi ile pozitif bulunmuştur [Ho ve ark., 2008].

Jain ve Mondal 130 *Klebsiella* bakterisinde GSBL sıklığını kombine disk difüzyon yöntemiyle belirlemiş; 64 (%49,23) izolatta GSBL enzimini göstermişlerdir [Jain ve Mondal, 2008].

Tayland'da kan örneklerinden izole edilen 31 *K. pneumoniae* bakterisiyle yapılan çalışmada hem klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle hem de ÇDST yöntemiyle geniş spektrumlu beta laktamaz pozitif tespit edilmiştir [Niumsup ve ark., 2008].

Ülkemizde ve Dünya'da yapılan çalışmaların GSBL oranlarını kıyasladığımızda birbirinden farklı sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Geniş spektrumlu beta laktamaz varlığına ilişkin veriler yıldan yıla, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, geniş

spektrumlu antibiyotiklerin kontrolsüz ve sık kullanılmalarından, hastaların özelliklerindeki farklılıklardan ve değişik tedavi yöntemlerden kaynaklanabilir.

Yapılan çalışmada da yüksek oranda GSBL (ÇDST ile %66, klavulonik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle %59,37) pozitifliği gözlemlenmiştir.

Araştırmada GSBL enzimi fenotipik yöntemlerle belirlendikten sonra 128 izolat PZR yöntemiyle TEM ve SHV primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jeller hazırlanarak yürütülmüştür. PZR ürünlerinin jelde görüntülenmesi sonucu SHV primerinde 72 izolatta 293 bp'lik bant oluşumu, TEM primerinde 51 izolatta 966 bp'lik bant oluşumu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 23 *K. pneumoniae* ve 4 *K. oxytoca* bakterisinde hem ÇDST yöntemiyle hem de TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı belirlenmiştir. 6 *K. pneumoniae* ve 3 *K. oxytoca* bakterisinde sadece ÇDST yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı tespit edilmiştir. 15 *K. pneumoniae* ve 4 *K. oxytoca* bakterisinde ise ÇDST yöntemiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi belirlenemezken TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı belirlenmiştir. 30 *K. pneumoniae* ve 1 *K. oxytoca* bakterisinde ÇDST yöntemiyle ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında, 12 *K. pneumoniae* ve 6 *K. oxytoca* bakterisinde ÇDST yöntemiyle ve TEM primerleriyle yapılan PZR çalışmasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi taşıdığı tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan 128 izolatın 9'unda genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimi sadece ÇDST yöntemiyle belirlenmiştir, TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmalarında GSBL enziminin belirlenememesi bu izolatların farklı tip GSBL taşımalarından kaynaklanabilir.

TEM ve SHV tip GSBL'ler, diğer tip GSBL'ler arasında en çok bulunan ve en sık çalışılan GSBL'lerdir. Bu tip GSBL'lerin yapısında meydana gelen bir

veya birkaç nokta mutasyonu (aminoasit değişikliği) sonucu enzimin etki spektrumu genişlemektedir. Araştırmamızda *Klebsiella* bakterilerinin TEM (39,84) ve SHV (56,25) tip beta laktamaz genlerine sahip olduğunu belirlenmiştir. Yine Ülkemizde ve Dünya’da TEM ve SHV tip GSBL ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar vardır.

Kore’de yapılan bir çalışmada 53 *K. pneumoniae* bakterisinin 39’unun (74%) SHV tip beta laktamaz taşıdığı tespit edilmiştir [Kim ve ark., 1998].

Chang ve ark. Tayvan’da on hastaneden topladıkları 113 *K. pneumoniae* bakterisinde SHV ve TEM tip beta laktamaz üretimini araştırmışlar. PZR ile bütün izolatlarda SHV geni belirlenirken sadece 32 izolatta TEM geni tespit etmişlerdir [Chang ve ark., 2001].

Türkiye’de yapılan bir çalışma, nozokomiyal enfeksiyonu olan hasta örneklerinden izole edilen 85 *Escherichia coli* ve 83 *Klebsiella pneumoniae* suşunda, TEM ve SHV türü beta-laktamaz sıklığı araştırılmıştır. İzolatlarda blaTEM ve bla SHV varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiştir. Toplam 168 bakterinin 150’sinde (%89.3) blaTEM veya bla SHV saptanmıştır. *E. coli* suşlarının %78. 8’inde ve *K. pneumoniae* suşlarının %69.9’unda blaTEM tanımlanmış, blaSHV pozitifliği ise sırasıyla %47.1 ve %59 oranlarında bulunmuştur. Tüm izolatların %38.1’inin blaTEM ve blaSHV’yi birlikte taşıdığı ve *E. coli* suşlarının %85.9’u ile *K. pneumoniae* suşlarının %92.8’inin TEM veya SHV’ye ait genleri içerdiği görülmüştür [Esen ve ark., 2001]

Yine Türkiye’de yapılan bir çalışmada 41 *K. pneumoniae* bakterisinde TEM ve SHV genleri PZR ile araştırılmış; 19 izolatta TEM, 20 izolatta SHV tip beta laktamaz belirlenmiştir [Hoşoğlu ve ark., 2007].

Özgümüş ve ark. *Enterobacteriaceae* familyasına ait 133 klinik izolat toplamış, 133 izolatın 20’sinde (9 *E.coli*, 7 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 2

Enterobacter aerogenes) ÇDST ile GSBL varlığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu 20 izolatta TEM ve SHV tip GSBL PZR ile çalışılmıştır. PZR çalışmasının sonuçlarına göre 5 izolatta sadece SHV tip gen, 12 izolatta hem SHV hem de TEM tip gen, 3 izolatin ise SHV veya TEM tip gen taşımadığı belirlenmiştir [Ozgumus ve ark., 2008].

Jain ve Mondal 64 GSBL üreten *Klebsiella* bakterisinin 17'sinin hem TEM hem de SHV; 31'inin sadece TEM; 13'ünün ise sadece SHV tip gen içerdiğini bulmuştur [Jain ve Mondal, 2008].

Lal ve ark. 204 *Klebsiella* bakterisinin 170'inde GSBL tespit etmişlerdir. GSBL pozitif 170 izolatin 95'inde TEM ve SHV genleri PZR ile araştırmışlar. PZR ile çalışılan izolatların %67,3'ü hem SHV hem de TEM gen içerirken, %20'si sadece TEM, %8,4'ü ise sadece SHV tip gen taşıdığını belirlemişlerdir. [Lal ve ark., 2007].

Araştırmada 128 izolatin Plazmid DNA izolasyonu Sambrook'un tanımladığı yöntemle yapılmıştır. *Klebsiella* bakterilerinin Plazmid DNA incelemesinde kullanılan 128 izolatin 42'sinde 1-10 arasında değişen sayılarda plazmidlere rastlanılmıştır. Bu plazmidlerin moleküler ağırlıklarının 1,375 ve >21,226 kb arasında olduğu belirlenmiştir. 86 *Klebsiella* bakterisinin ise plazmid DNA içermedikleri gözlenmiştir. Plazmid DNA bulunan 42 izolatin 32'sinde ÇDST yöntemi veya TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında GSBL taşıdığı belirlenmiştir. GSBL taşımayan fakat plazmid DNA taşıyan diğer 10 izolatta bulunan bu extra kromozomal DNA'ların farklı özellikler taşıdığı düşünülmektedir. Plazmid DNA içermeyen 76 *Klebsiella* bakterisinin 22'sinin TEM ve SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında GSBL taşımadığı 54'ünün ise TEM veya SHV primerleriyle yapılan PZR çalışmasında GSBL taşıdığı tespit edilmiştir. Plazmid DNA içermeyen fakat SHV ve TEM primerleriyle yapılan PZR çalışmasında GSBL enzimi tespit edilen 54 izolatta, bu enzimin kromozomal kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan PZR-RFLP yönteminde genomik DNA'nın belirli bir bölgesi spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen ürünler restriksiyon enzimi ile kesilerek, agaroz jel elektroforez ile ayrılmış ve jel ethidium bromid ile boyanmıştır, son olarak ultraviole ışık altında görüntüleme işlemi yapılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinde görülen farklı büyüklük ve sayıdaki fragmentler, üründe görülen mutasyonları belirlemektedir. PZR-RFLP analizi ile blaSHV genleri varyantlarının ayrımı yapılabilmektedir. Ayrıca PZR-RFLP analizi TEM tip beta laktamazın belirlenmesinde kullanılan moleküler yaklaşımlardan birisidir. [Bradford, 2001]. Çalışmada kullanılan *NheI* restriksiyon enzimi ile kesilen ürünler mutasyon sonucu 238. pozisyonundaki gliserinde meydana gelen değişiklikleri belirlemektedir. Araştırmada *NheI* ile kesilen SHV tip ve TEM tip GSBL bulunan izolatlarda, PZR-RFLP yöntemi ile aranan mutasyonlar tespit edilmemiştir. Bu nedenle izolatlarda aranan bu mutasyonların dışında, bir nedene bağlı geniş spektrumlu beta laktamaz direnci gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.

Araştırma bulgularımız *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* bakterilerinin yüksek oranda TEM (39,84) ve SHV (56,25) tip beta laktamaz genlerine sahip olduğunu göstermiştir. Bu tip çalışmalar farklı ülkelerdeki değişik bölgelerden izole edilen *Klebsiella* bakterilerinin GSBL enziminin tespit edilmesi ve oranlarının belirenebilmesi açısından önemlidir.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermeleri sebebiyle enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler bakterisid etkili olması ve yan etkilerinin az olması nedeniyle tedavide oldukça sık kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak bu ilaçların klinikteki kullanımı arttıkça bu antibiyotiklere karşı özellikle beta-laktamazlara bağlı direnç de artmaya başlamıştır [David ve Livermore, 1995]. Bu nedenle bakterilerin beta-laktamaz üretimlerinin araştırılması ve antibiyotik direnç durumlarının izlenip klinisyenlere bildirilmesi bu mikroorganizmalarla oluşmuş

enfeksiyonların erken ve etkili antibiyotik tedavisinde önemlidir. Bir bakterinin GSBL ürettiği saptandığında in vitro duyarlılık sonucu ne olursa olsun, tüm sefalosporinler, penisilin türevleri ve monobaktamlara dirençli olarak rapor edilmelidir [NCCLS, 2003].

Sonuç olarak; GSBL üreten bakterilerin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi ve klinisyenlere bildirilmesi enfeksiyonun tedavisi açısından oldukça önemlidir. Çalışmada kullanılan moleküler yöntemler belirli grupta yer alan GSBL tiplerinin belirlenebilmesi açısından ve kısa sürede sonuç verdiği için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılması gereken yöntemler arasına girmelidir.

KAYNAKLAR

Açıkgöz, Z.C., Gülay, Z., Biçmez, M., Göcer, S., Gamberzade, S., "CTX-M3 extended spectrum beta-lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: First report from Turkey", **Scand. J. Infection Dis.**, 35: 503-505 (2003).

Akçam, F.Z., Gönen, İ., Kaya, O., Yaylı, G. "Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması", **Klimik Derg.**, 17(1): 47-9 (2004).

Akman, S., "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella* Bakterilerinin identifikasyonu ve Enzimatik Aktivitesi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 64 (2008).

Akova, M., "Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Var!.", **ANKEM Dergisi**, 18 (2): 98-103 (2004).

Akyıldız, R., Özsoy, M.F., Altunay, H., Koçak, N., Çavuşlu, Ş., Yenen, O.Ş., "K. pneumoniae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Beta Laktam Antibiyotik Direncinin Araştırılması", **Klimik Derg.**, 11(2): 53-58 (1998).

Altun, B., Kocagöz, S., Haşçelik, G., Akova, M., "Resistance to antibiotics in *Acinetobacter spp.* isolated from nosocomial bloodstream infections", **Program and Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, San Diego, CA; 94: Abst no. C2-316 (2002).

Ambler, R.P., "The structure of beta-lactamases", **Phil Trans R Society Biology Londra**, 289: 321-331 (1980).

Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Pages, J. M. "Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*", **Antimicrobial Agents Chemother.**, 45: 2615-20 (2001).

Bilgehan, H., "Klinik Mikrobiyoloji", **Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları**, 56-64 (1996).

Bonfiglio, G., Russo, G., Nicoletti, G. "Recent developments in carbapenems", **Expert Opin Investig Drugs**. 11(4): 529-44 (2002).

Bonomo, R.A., Rudin, S.A., Shlaes, D.M., "Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A beta-lactamases", **FEMS Microbiol. Lett.**, 148: 59-62 (1997).

Bozkurt, H., Kurtoğlu, M. G., Aygöl, K., Bayram, Y., Berktaş, M. "Nozokomiyal Kaynaklı *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi", **Turkish Medical Journal** 1:150-153, (2007).

Bradford, P.A., "Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat", **Clin. Micr.Rev.**, 14: 933-51 (2001).

Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., "A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure", **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39: 1211-33 (1995).

Bush, K., Miller, G.H., "Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes", **Current Opin. Microbiology**, 1: 509-515 (1998).

Bush, K., "New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy", **Clin. Inf. Dis.**, 32: 1085-1089 (2001).

Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L., And Bravo, A. "Specific PCR Primers Directed To Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection", **Appl. Environ Microbiol.**, 61(11): 3826–3831 (1995).

Chaibi, E.B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R., "Inhibitor-resistant TEM-beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics", **J. Antimic. Chemother.**, 43: 447-458 (1999).

Chambers, H. F., Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). "Principles and Practice of Infectious Diseases", Sixth edition, **Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc.**, 281-93 (2005).

Chang, F-Y., Siu, L.K., Fung, C-P., Huang, M-H., Ho, M., "Diversity of SHV and TEM b-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel b-Lactamases, SHV-25 and SHV-26" **Antimic. Agents Chemother.**, 45(9): 2407-2413, (2001).

Chawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J. ve Lulitanond, A., Hawkey, P. M., "SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum betalactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand", **J. Antimic. Chemother.**, 48: 839-852 (2001).

Colodner, R., "Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists", **Am J Infect Control** 33(2): 104-107 (2005).

Danel, F., Hall, L.M.C., Gür, D., Akalın H.E., Livermore, D.M. "Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*", **J. Antimicrob. Chemother.**, 35: 281-294 (1995).

Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D., Livermore, D.M., "OXA-16.a further extended spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates", **Antimic. Agents Chemother.**, 42: 3117-3122 (1998).

Danel, F., Hall, L.M.C., Duke, B., Gür, D., Livermore, D.M., "OXA-17,a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa*", **Antimic. Agents Chemother.**, 43: 1362-1366 (1999).

David M., Livermore D.M., "Beta Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance". **Clinical Microbiology Reviews**, (1): 557-584 (1995).

Edwards, J. R., "Meropenem: a microbiological overview", **J Antimicrob Chemother.** 36(Suppl A): 1-17. (1995).

Emery, C., L., Weymouth, E., "Detection and clinical significans of Extended Spectrum Beta Lactamases in Tertiary-Care Medical Center", **J. Clinic. Microbiol.**, 35: 2061-2067 (1997).

Endtz, H. P., Dijk, W. C., Verbrugh, H. A., Mustin Study Group. Comparative in vitro activitiy of meropenem against selected pathogens from hospitalized patients in the Netherlands. **J Antimicrob Chemother.**, 39: 149-156 (1997).

Esen, Ş., Eroğlu, C., Sünbül, M., Leblebicioğlu, H. "*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında TEM ve SHV türü beta-laktamazların sıklığı", **Mikrobiyoloji Bült.** 35(1): 37-43 (2001).

Gniadkowski, M., Schneider, I., Jungwirth, R., Hryniewicz, W., Bauernfeind, A., "Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Three Polish Hospitals:Identification of Three Noel TEM- and SHV-5- Type Extended-Spectrum β -lactamases", **Antimic. Agents Chemother.**, 42(3): 514-520 (1998).

Gniadkowski, M., "Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms", **Clinic. Microb. Infect.**, 7: 597-608 (2001).

Gülay, Z., "Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve Karbapenemlere direnç", **Hastane İnfek. Derg.**, (5): 210-229 (2001).

Gür, D., "Beta laktamazların sınıflandırılması", **Flora**, 2,80-86 (1996).

Gür, D., "Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları", **Hastane İnfek. Derg.**, 1: 38-45 (1997).

Gür, D., "Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi", İstanbul, **Nobel tıp kitabevleri**, 182-193 (2002).

Gür, D., "GSBL'lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar", **Bilimsel Tıp Yayınevi**, Ankara, 5-12 (2004).

Gür, D., "Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar", In: Ulusoy S.(ed) Beta laktamazlar ve klinik önemi", Ankara, **Bilimsel Tıp Yayınevi.**, 70-84 (2005).

Hall, L.M.C., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H.E., "OXA-II. an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*", **Antimic. Agents Chemother.**, 44: 1637 (1993).

Ho, P-L., Wong, R, C-W., Chow, K-H., Yip, K., Wong, S., S-Y., Que, T-L., "CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults", **J Microbiol Immunol Infect.**, 41:428-432 (2008).

Hoşgör, M., Özkan, F., Yapar, N., Tunger, A., Özinel, M. A., "Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Belirlenmesinde Çift Diskli Sinerji Testi ile Üç Boyutlu Yöntemin Karşılaştırılması" **Klinik Dergisi**, 11(2): 59-60 (1998).

Hoşoğlu, S.; Gündeş, S.; Kolaylı, F.; Karadenizli, A.; Demirdağ, K.; Günaydin, M.; Altındis, M.; Çaylan, R. & Ucmak, H., "Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals", **Indian J Med Microbiol.**, 25(4):346-350 (2007).

Jain, A., Mondal, R., "Prevalence & antimicrobial resistance pattern of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* spp. isolated from cases of neonatal septicaemia", **Indian J Med Res.**, 125(1): 89-94 (2008).

Jehl, F., Chomarat, M., Weber, M., Gerard, A., "Antibiyotik Duyarlık Testinden Reçeteye", 2. baskı [Çeviri]. **Biomerieux Yayınları**, (2003).

Kim, J., Kwon, Y., Pai, H., Kim, J-W., Cho, D-T., "Survey of *K. pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum β -lactamases: Prevalence of SHV-12 and Shv-2a in Korea", **J. Clinic. Microbiol.**, 36(5): 1446-1449 (1998).

Lal, P., Kapil, A., Das, B. K., "Occurrence of TEM and SHV gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital", **Indian J Med Res**, 125:173-178 (2007).

Leung-Kei, S., "Antibiotics: action and resistance in gram negative bacteria", **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, 35: 1-11 (2002).

Livermore, D. M., "Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance", **Clin Microbiol Rev.**, 8:557-584 (1995).

Livermore, D. M., "Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control", **J Antimicrobial Chemotherapy** 41(1):25-41, (1998).

Livermore, D. M., Woodford, N., "Carbapenemases: a problem in waiting? " **Curr Opin Microbiol.** 3(5): 489-495 (2000).

Medeiros, A.A., "Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics", **Clin. Infect. Dis.**, 24: 19-45 (1997).

Mumcuoğlu, İ., Gündüz, T., Baydur, H., "*Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu", **Ankem Derg.**, 18(1):9-11 (2004).

National committee for clinical laboratory standards. Antibiyotik disk duyarlılık yöntemleri için uygulama standartları, Onaylanmış standart , Disk difüzyon için ek Çizelgeler. 8. basım **Villanova, Pa.** (2003).

Neu, H. C., "Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity", **Am J Med.**, 79(2A):2-13 (1985).

Niumsup, P. R., Tansawai, U., Boonkerd, N., Polwichai, P., Dejsirilert, S. "Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals", **J Infect Chemother.**, 14:404–408 (2008).

Normdan, P., Guibert, M., "Extended spectrum beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*", **Microbiology**, 42:128-31 (1998).

Opal, S, M., Medeiros, A. A., "Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases", Sixth edition, **Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc**, 253-70 (2005).

Ozgumus, O. B., Tosun, I., Aydın, F., Kilic, A. O., "Horizontal Dissemination Of Tem- And Shv-Type Beta-Lactamase Genes-carrying Resistance Plasmids Amongst Clinical Isolates Of *Enterobacteriaceae*", **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:636-643 (2008).

Öksüz, L., Gürler, N., Akıncı, N., Şirin, A., " İki aylık bir dönemde pediatrik poliklinik hastalarının idrar örneklerinden izole edilen GSBL oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşları", **ANKEM Dergisi**, 22(1):14-19 (2008).

Öncül, O. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, **Akılcı Antibiyotik Kullanım ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar, Sempozyum Dizisi** 31: 23-38 (2002).

Özgüneş, I., Erben, N., Kiremitçi, A., Kartal, E.D., Durmaz, G., Çolak, H., Usluer, G., Çolak, E., "The prevalence of extended-spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates and risk factors", **Saudi Med J.**, 27(5):608-612, (2006).

Özkan, Ç., Oldacay, M., Erdem, G., "Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu Beta Laktamaz Sıklığı", **ANKEM Dergisi**, 16(1):65-68 (2002).

Poyart, C., Mugnier, P., Quesne, G., Berche, P., Trieu-Cuot, P., "A novel extended spectrum TEM-type beta-lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxolactam in *Klebsiella pneumoniae*". **Antimicrob Agents Chemother.**, 42:108-113 (1998).

Rupp, M.E., Fey, P.O., "Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment", **Drugs**, 63(4): 353-365 (2003).

Samaha-Kfoury, J.N., Araj, G.F., "Recent development in B-lactamases and extended spectrum beta lactamases", **British J Med.**, 327:1209-1213 (2003).

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular Cloning : A Laboratory Manual", Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **New York**, 1.25-1.27 (1989).

Sanders, C.C., Sanders. W.E.J.R., "Beta-lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact", **Clin Inf Dis**, 15: 829-39 (1992).

Sarı, H., "Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA / meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta- laktamaz varlığının araştırılması", Uzmanlık tezi, **İstanbul** 9, 11, 14 (2005).

Schooneveldt, J.M., Nimmo, G.R., Giffard, P., "Detection and characterisation of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infection", ***Pathology***, 30(2):164-8 (1998).

Shukla, I., Tiwari, R., Agrawal, M., "Prevalence of extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital", ***Indian J Med Microbiol.***, 22(2):87-91, (2004).

Sirot J., "Detection of extended-spectrum plasmid mediated β -lactamases by disk diffusion", ***Clin Microb Infect.***, 2 (1) : 35-9, (1996).

Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K. ve ark., "Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended spectrum beta-lactamase detection methods", ***J Clin Microbiol.***, 39(8):2864-72 (2001).

Sturenburg, E., Mack, D., "Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control", ***J. Infect.***, 47(4): 273-295 (2003).

Subha, A., and Ananthan, S., "Extended spectrum beta lactamase(ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai", ***Indian J Med Microbiol.***, 20(2):92-95, (2002).

Tasli, H., Bahar I. H. "Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey", ***Jpn J Infect Dis.***, 58(3): 162-167 (2005).

Ustaçelebi, Ş., Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A., Tümbay, E., Mete, Ö. "Temel ve Klinik Mikrobiyoloji", ***Güneş Kitabevi***, Ankara, 91-109, 509-511 (1999).

Vahaboglu, H., Hall, L.M., Mülazımoğlu, L., Dodanlı, S., Yıldırım, I., Livermore, D. M., "Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey", ***J Med Microbiol.***, 43(4): 294-299 (1995).

Vahaboglu, H., Dodanlı, S., Eroğlu, C. Öztürk, R., Söyletir, G., Yıldırım, İ., Avkan, V., "Characterization of multiple antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-I producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone", ***J. Clin. Microbiol.***, 34: 2942-2946 (1996).

Vahaboglu, H., Öztürk, R., Aygün, G., Coşkun, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioğlu, H., Balık, İ., Aydın, K., Oktun, M., "Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study", ***Antimic. Agents Chemother.***, 41: 2265-2269 (1997).

Vural Ece, G., "Klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *E.coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimi varlığının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 52 (2005).

Walsh, C., "Antibiotics", First ed., **ASM Pres**, Washington, (2003).

Weldhagen, G., Poirel, L., Nordmann, P., "Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact", **Antimic. Agents Chemother.**, 47: 2385-2392 (2003).

White, R., Friedrich, W. I., Burgess, D., Warkentin, D., Bosso, J. "Comperative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*", **Antimicrob Agents Chemother.**, 40(4): 904-8 (1996).

Yıldız, Ü., Durmaz, G., Us, T., Akgün, Y., "Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan enterik bakterilerin meropenem, imipenem, sefodizim, sefepim duyarlılıkları", **İnfeksiyon Dergisi**, 14:373-377 (2000).

Yong, D., Shin, J.H., Kim, S. Lim, Y., Yum, J-H., Lee, K., Chong, Y., Bauernfeind, A., "High prevalence of PER-I extended spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea", **Antimic. Agents Chemother.**, 47: 1749-1751 (2003).

Yorgancıgil, B., "Beta Laktam Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları", **Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi**, 6:2-9 (1999).

Yuluğ, N., "Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi", **ANKEM Derg.**, 11: 205-207 (1997).

Yüce, A., "Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları", **Klinik Dergisi**, 14: 41-46 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILMAZ, Ebru
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1977, Adana
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 15 04
 Faks : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : beyzi@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2002
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1999
Lise	Borsa Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-2009	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A) SCI Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1-Özer HA, Uraz G, Yılmaz E, Atasoy AF. The effects of brine concentration and scalding on survival of some pathogens in urfa cheese: a traditional white-brined Turkish cheese. *International Journal of Food Science and Technology* 39 (7): 727-735 2004

2- Seferoğlu Z, Ertan N, Yılmaz E, Uraz G. Synthesis, spectral characterisation and antimicrobial activity of new disazo dyes derived from heterocyclic coupling 2 components. *Coloration Technology*. 124 (1): 27-35 (2008).

3- Uraz, G., Bolat, S., Yılmaz, E., Sezgin, E. The distribution of Enterobacteriaceae and some pathogenic micro-organisms in nonbranded white cheese samples sold in Ankara city. *International Journal of Dairy Technology* 62(2):255-259 (2009).

B) SCI Dışında Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1- Uraz, G., Topçu, Ö., Sezgin, E., Yılmaz, E., Detection of Aflatoxin M1 in raw milk samples consumed in Ankara. *Advances in Food Sciences* 30(4):236-239(2008).

C) Özeti Basılmış Uluslar Arası Kongre Tebliğleri

1.The Third International Congress, "Enviromental Micropaleontology, Microbiology and Meibenthology 1-6 September 2002, Vienna/Austria. The alteration of O₁₅₇:H₇ *E. coli* . number for fresh for Urfa cheese and 90 days maturation period
Uraz, G., YILMAZ, E

2. International Dairy symposium, Isparta, TURKEY, 2004

Effect of termal boiling process and salt concentrations in local Urfa cheese produced which inoculated *Bacillus cereus*

G. Uraz, E. YILMAZ, B. ÖZER

3. 4th International Congress "Environmental Micropaleontology, Microbiology and Meiobenthology" Isparta, Turkey, September 13-18, 2004

The count of yeast in local Urfa cheese.

G. Uraz, E. YILMAZ & B. Ozer

4. 4th International Congress "Environmental Micropaleontology, Microbiology and Meiobenthology" Isparta, Turkey, September 13-18, 2004.

The lipolitic enzyme activity at the Staphylococcus isolated from the abcess, the blood culture, drain and other clinical samples.

G. Uraz, B. Karabüber & E. YILMAZ

5. International Symposium on Medicinal Chemistry Reseach and Development, 2005 Kuşadası/Turkey

Synthesis and antimicrobial activity of two heterylazoindole dyes

Seferoglu, Z., YILMAZ E., Öncül, Ö., Uraz, G., Ertan, N

6. International Conference on Environment: Survival and Sustainability Nicosia, Northen Cyprus, 19-24 Şubat 2007

Determination of Extented Spectrum Beta lactamase enzyme of Klebsiella genus Isolated From Clinical Samples

G. Uraz, E. YILMAZ

7. International Conference on Environment: Survival and Sustainability Nicosia, Northen Cyprus, 19-24 Şubat 2007

Antimicrobial activity of some heterylazoindole dyes

Seferoglu, Z., Ertan, N, YILMAZ E., Uraz, G.,

8. XII. International Congress of Mycology 5-9 August 2008 İstanbul

Isolation of the Yeast From Raw Milk And Cheese Samples Sold in Ankara

Güven URAZ, Özlem TOPÇU, Emel SEZGİN, Ebru YILMAZ

9. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 5-9 August 2008 İstanbul

The antibiotic sensitive of *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella* bacteria isolated from urine culture of patients have high PSA value

Güven URAZ, Arzu TIBİK, Ebru YILMAZ

10. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 5-9 August 2008 İstanbul

Frequency of extended spectrum beta lactamase enzymes in *Klebsiella* strains isolated from clinical samples

URAZ, G., YILMAZ, E.

D) Özeti Basılmış Ulusal Kongre Tebliğleri

1. Klimik 2003, IX. Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 2003, Türkiye

Urfa Peynirlerinde sıcaklık ve tuz konsantrasyonunun *Yersinia enterocolitica* bakterisinin üremesi üzerine etkisi

G. URAZ, E. YILMAZ

2. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adana/Türkiye

Yöresel Urfa Peynirlerinde 90 Gün Olgunlaşma Süresi Boyunca *Shigella flexneri*'nin Üremesinin Değerlendirmesi

G. URAZ, Ebru YILMAZ

3. İkinci Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi İstanbul/Türkiye 18-20 Eylül 2006

Ankara bölgesinden sağlanan içme sularında *E. coli* ve koliform bakterilerin araştırılması

Serkan Şeker, Buket Er, Gülderen Yentür, Güven URAZ, Ebru YILMAZ

4. V. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan Enfeksiyonlar simpozyumu, Samsun/Türkiye 7-10 Nisan 2007

Enterococcus faecalis ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin Salmonella Türleri ve Staphylococcus aureus Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

G. URAZ, Derya ETÖZ, Ebru YILMAZ

5. V. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan Enfeksiyonlar simpozyumu, Samsun/Türkiye 7-10 Nisan 2007

Pazarda Satılan Peynirlerden bazı Patojen Bakterilerin İzolasyonu ve Bu Bakterilerin Proteolitik, Lipolitik aktivitelerinin Belirlenmesi

Güven URAZ, Emel SEZGİN, Serpil BOLAT, Ebru YILMAZ

6. V. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan Enfeksiyonlar simpozyumu, Samsun/Türkiye 7-10 Nisan 2007

Sokak Sütlerinden İzole Edilen *Salmonella*, *Shigella* ve API 20E ile adlandırılan Diğer *Enterobacteriaceae* Türleri

Güven URAZ, Emel SEZGİN, Merve ÜZÜM, Ebru YILMAZ

7. Pamukkale süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Denizli 21-23 Mayıs 2009

Kefirden izole edilen Laktik asit bakterilerinin ve bazı mayaların *Klebsiella pneumoniae* ve *K. oxytoca* bakterileri üzerine antimikrobiyal aktivitesi

Güven URAZ, Derya ETÖZ, Salih ÖZCAN, Ebru YILMAZ

8. Pamukkale süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Denizli 21-23 Mayıs 2009

Kefirden izole edilen *C. kefir* ve *C. famata*'nın *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei* ve *S. flexneri* bakterileri üzerine antimikrobiyal aktivitesi

Güven URAZ, Derya ETÖZ, Salih ÖZCAN, Ebru YILMAZ

E. Görev aldığı projeler

1. Proje No :FEF-05/2001-14
 Proje Yürütücüsü :Doç. Dr. Güven URAZ
 Projedeki görevi : Yardımcı Araştırmacı
 Proje Adı :Çiğ süttten izole edilen psikrotrofil ve mezofil *Pseudomonas*'ların lipolitik, proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi ve *Stafilococcus* türleri üzerine antagonistik etkisi.

2. Proje No :FEF-05/2002-38
 Proje Yürütücüsü :Prof. Dr. Güven URAZ
 Projedeki görevi : Yardımcı Araştırmacı
 Proje Adı : Urfa peynirlerinde bazı patojen mikroorganizmaların değerlendirilmesi

3. Proje No :FEF-05/2005-33
 Proje Yürütücüsü :Prof. Dr. Güven URAZ
 Projedeki görevi : Yardımcı Araştırmacı
 Proje Adı : Ankara yöresinde satışa sunulan sokak sütleri ve peynirlerinde *Salmonella* *Shigella* ve diğer bazı patojenlerin ve fungusların izolasyonu, identifikasyonu ve aflatoksin araştırması

4. Proje No :FEF-05/2007-36
Proje Yürütücüsü :Prof. Dr. Güven URAZ
Projedeki görevi : Yardımcı Araştırmacı
Proje Adı :Klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae*
suşlarında genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz enziminin PCR-
RFLP yöntemi ile araştırılması