

ESCHERICHIA COLI, KLEBSIELLA VE ACINETOBACTER
SUŞLARINDA PLAZMİT VEYA KROMOZOMAL KAYNAKLI
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ

Elif Burcu BALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK 2007
ANKARA

Elif Burcu BALI tarafından hazırlanan *ESCHERICHIA COLI*, *KLEBSIELLA* VE *ACINETOBACTER* SUŞLARINDA PLAZMİT VEYA KROMOZOMAL KAYNAKLI GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile BİYOLOJİ Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim SULTAN

.....

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Tarih: 17 / 12 / 2007

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

Prof. Dr. Nermin ERTAN

.....

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.

Elif Burcu BALİ

***ESCHERICHIA COLI, KLEBSIELLA* VE *ACINETOBACTER*
SUŞLARINDA PLAZMİT VEYA KROMOZOMAL KAYNAKLI
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ**
(Yüksek Lisans Tezi)

Elif Burcu BALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Aralık 2007

ÖZET

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalara ait çeşitli kültür örneklerinden izole edilen toplam 94 suş incelenmiştir. Suşların %53,2'si *Escherichia coli*, %20,2'si *Acinetobacter baumannii*, %18,1'i *Klebsiella pneumoniae*, %4,3'ü *Klebsiella oxytoca*, %2,1'i *Klebsiella terrigena*, %2,1'i ise *Klebsiella ornithinolytica* olarak adlandırılmıştır. Suşlardaki genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı çift disk sinerji testi (ÇDST) ile tespit edilmiştir. ÇDST sonucunda suşların %69'unun GSBL enzimi ürettiği, %31'inin ise üretmediği saptanmıştır. Suşların plazmit DNA'ları izole edilmiştir. 71 izolatta plazmit DNA tespit edilmiş, 23 izolatta ise plazmit DNA'ya rastlanmamıştır. İzolatların 0,4 kb ile 19,3 kb arasında değişen büyüklüklerde 1–10 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. Plazmit taşıyan GSBL pozitif 58 izolat akridin oranj (AO) çözeltisi (mg/ml) ile muamele edilmiş ve tekrar plazmit DNA izolasyonuna alınmıştır. AO uygulanan suşların %81'inde plazmit DNA bantlarının AO uygulanmayanlara göre daha ince olduğu görülmüştür. ÇDST sonucunda AO uygulanan izolatların %6,9'unda antibiyotik direncinin azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle suşların %6,9'unda GSBL üretiminin plazmit kaynaklı olabileceği

düşünülmüştür. Geriye kalan suşlarda (%93,1) GSBL yapımının plazmit kaynaklı olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun AO'nun tüm suşların plazmitlerini gideremediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İzolatların GSBL enzim tiplendirilmesi için TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri tasarlanmış ve bu primerler kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile hedef diziler çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin dizi analizleri yapılarak DNA gen veritabanında BLAST yazılımı ile karşılaştırılmaları yapılmış ve buna göre suşların %50'sinde TEM, %14,87'sinde SHV, %11,7'sinde CTX-M tipi GSBL olduğu tespit edilmiştir. %23,43'ünde GSBL tiplerine rastlanmamıştır. PZR'de ÇDST'de tespit edilemeyen iki izolatın GSBL pozitif olduğu bulunmuştur.

Bilim Kodu : 203.1.104

Anahtar Kelimeler : GSBL, ÇDST, Akridin oranj, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sayfa Adedi : 105

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**MOLECULAR INVESTIGATION OF PLASMID OR CHROMOSOMAL
MEDIATED EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES EXISTANCE
IN *ESCHERICHIA COLI*, *KLEBSIELLA* AND *ACINETOBACTER* STRAINS
(M. Sc. Thesis)**

Elif Burcu BALİ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December 2007**

ABSTRACT

In this study, total of 94 strains isolated from various culture samples which belong to patients applied to Microbiology Laboratory of Gazi University Medical Faculty Hospital were investigated. 53,2%, 20,2%, 18,1%, 4,3%, 2,1% and 2,1% of isolates were termed as *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena* and *Klebsiella ornithinolytica* respectively. In strains existence of extended spectrum beta lactamase (ESBL) was determined by double disk synergy test (DDST). In a result of DDST, it was detected that 69% of strains produced ESBL, 31% of strains didn't produce ESBL. Plasmid DNAs of the isolates were isolated. 71 of the isolates contained from 1 to 10 plasmid DNA changing from 0,4 kb to 19,3 kb in size while 23 isolates had no plasmid DNA. ESBL positive 58 strains were treated with acridine orange (AO) solution and plasmid DNA reisolated. Plasmid DNA bands which 81% of strains treated with AO were thinner than plasmid DNA bands not threatened with AO. In a result of DDST, antibiotics resistance of 6,9% of strains were more less than strains not treated with AO. So, it was thought that existence of ESBL was as a plasmid origin in 6,9% of strains. 93,1% of strains were thought to be as a chromosomal origin because of all plasmids weren't cured with AO. TEM, SHV, CTX-M and OXA primers were designed for enzyme typing of isolates. Target sequence were amplified by

polimerase chain reaction (PCR). PCR products were sequenced and they were compared with DNA gene bank sequences in BLAST software. According to this, 50%, 14,87% and 11,7% of strains were detected as TEM, SHV and CTX-M types ESBL respectively. There is no ESBL types in 23,43% of strains. In PCR two isolate which couldn't detected in DDST were found ESBL positive.

Science Code : 203.1.104
Key Words : ESBL, DDST, Acridine orange, Polimerase chain reaction
Page Number : 105
Adviser : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bana bilgi ve deneyimleri ile yön veren sayın hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK'a ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Nedim SULTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezin değerlendirilmesinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yaptığım çalışmalar boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye, araştırma görevlisi sayın Dr. Fatma ÖZTÜRK'e ve sayın Selcen BABAOĞLU AYDAŞ'a,

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yaptığım çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Kayhan Çağlar'a, sayın Uz. Dr. Bilge Sipahi'ye ve sayın Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e ve diğer labarotuar çalışanlarına,

Çalışmalarımda dostluk ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Neslihan KAVALCIOĞLU'na, Filiz Sezen BİRCAN'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi destekleri ve ilgileriyle hayatım boyunca yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin yapılmasında 05/2007-39 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beta-Laktamazların Genel Özellikleri	3
2.2. Beta-Laktamazların Hücredeki Yeri ve Sentezi	4
2.3. Beta-Laktamazların Taşınma Şekli	4
2.4. Beta-Laktamazların Etki Mekanizmaları	5
2.5. Beta-Laktamazların Sınıflandırma Şeması	6
2.6. Beta- Laktamazların İsimlendirilmesi	10
2.7. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Genel Özellikleri	10
2.8. GSBL Tipleri ve Bakteriyel Türler	11
2.9. GSBL Saptama Yöntemleri	16
2.9.1. Fenotipik yöntemler	16
2.9.2. Moleküler yöntemler	19

Sayfa

2.10. GSBL Belirlenmesinin Klinik Önemi	28
2.11. Plazmitler, Transpozonlar ve GSBL'leri Kodlayan Plazmitlerin Özellikleri.....	28
2.12. Akridinler (Priflavin, Akriflavin, Akridin Oranj) ve Akridinlerin DNA Üzerine Mutajenik Etkileri.....	32
2.13. Akridin Oranj ve Kullanım Alanları	34
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Bakteri örnekleri.....	35
3.1.2. Besiyerleri ve ayıraçlar	35
3.1.3. Tampon ve çözeltiler.....	37
3.2. Metot	39
3.2.1. Bakterilerin seçilmesi.....	39
3.2.2. Bakterilerin tanımlanması	39
3.2.3. Çift disk sinerji testi	42
3.2.4. Gram (-) bakterilerden plazmit DNA izolasyonu.....	42
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	43
3.2.6. Plazmit DNA büyüklüklerinin hesaplanması.....	43
3.2.7. Akridin oranj ile plazmitlerin giderilmesi.....	44
3.2.8. Kromozomal DNA izolasyonu.....	45
3.2.9. Primerlerin tasarlanması	45

Sayfa

3.2.10. PZR ile GSBL genlerinin analizi ve GSBL tiplerinin belirlenmesi	46
3.2.11. DNA dizi analizi ile GSBL tiplerinin belirlenmesi	46
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Bakterilerin Tanımlanması.....	47
4.2. Çift Disk Sinerji Testi	52
4.3. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> ve <i>Acinetobacter</i> Suşlarının Plazmit DNA Profil Analizleri.....	54
4.4. GSBL Üretiminin Plazmit veya Kromozomal Kökeninin Araştırılması.....	61
4.5. GSBL Genlerinin PZR ile Tiplendirilmesi ve Dizi Analizi Sonuçları	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	105

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Ana beta-laktamaz gruplarının fonksiyonel ve moleküler özellikleri	9
Çizelge 2.2. GSBL genlerini taşıyan plazmitlerin özellikleri	31
Çizelge 3.1. GSBL genlerinin belirlenmesi için tasarlanan primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri	39
Çizelge 4.1. İzole edilen bakterilerin TSI agar reaksiyonları ve IMVIC test sonuçları	47
Çizelge 4.2. İzole edilen bakterilerin üreaz aktiviteleri ve hareket yetenekleri	47
Çizelge 4.3. Bakterilerin klinik örneklerle ve türlere göre dağılımı	49
Çizelge 4.4. GSBL (+) bakteri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları	51
Çizelge 4.5. GSBL (-) bakteri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları	51
Çizelge 4.6. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> ve <i>Acinetobacter</i> türlerinin plazmit DNA sayıları ve plazmit büyüklükleri.....	55
Çizelge 4.7. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> ve <i>Acinetobacter</i> suşları için ÇDST’de kullanılan antibiyotiklerin direnç, duyarlılık ve orta duyarlılık zon çapları... ..	69
Çizelge 4.8. Akridin oranj uygulanan ve uygulanmayan suşların antibiyotik zon çapları.....	69
Çizelge 4.9. TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleriyle pozitif reaksiyon veren izolatların dağılımı	75
Çizelge 4.10. <i>E. coli</i> 54 (DQ256080) izolatının TEM-144 tipi GSBL (+) <i>E. coli</i> suşu ile dizi eşleştirme sonucu	80
Çizelge 4.11. <i>K. pneumoniae</i> 19 izolatının SHV tipi GSBL (+) <i>K. pneumoniae</i> 763 izolatı (DQ219476) ile dizi eşleştirme sonucu	81

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 4.12. <i>K. pneumoniae</i> 79 izolatının CTX-M-15 tipi GSBL (+) <i>K. pneumoniae</i> (DQ302097) izolatı ile dizi eşleştirme sonucu	82
--	----

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Penisilin direncinin sağlanması	5
Şekil 2.2. PZR döngüsünün sistematik şekli	22
Şekil 2.3. Sanger tarafından geliştirilen nükleotit dizi analizi	25
Şekil 2.4. Maxam-Gilbert yöntemiyle oligonükleotit dizileme	27
Şekil 2.5. pBR322 plazmiti	29
Şekil 2.6. Transpozon hareketi	30
Şekil 2.7. Akridin boyalarının moleküler yapıları	33
Şekil 4.1. Bakterilerin türlere göre yüzde dağılım oranları	48
Şekil 4.2. Bakterilerin klinik örneklerle göre dağılımı	49
Şekil 4.3. Klinik örneklerle göre GSBL (+) ve GSBL (-) suşların dağılımı	52
Şekil 4.4. TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri ile çalışan bakteri suşlarının yüzde oranları	75
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> 53 izolatının TEM-R primeri için kromatogram sonucu	77
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> 17 izolatının SHV-R primeri için kromatogram sonucu	78
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> 90 izolatının CTX-M-R primeri için kromatogram sonucu	79

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Çift disk sinerji yöntemi	17
Resim 4.1. <i>A. baumannii</i> 88, <i>K. pneumoniae</i> 79 ve <i>K. oxytoca</i> 52 suşlarının API 20E test kiti ile verdikleri reaksiyonlar	48
Resim 4.2. ÇDST’de GSBL (+) ve GSBL (-) bazı suşlar	53
Resim 4.3. <i>Klebsiella</i> suşlarına ait plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforezi	57
Resim 4.4. <i>E. coli</i> ve <i>Acinetobacter</i> suşlarına ait plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüleri	58
Resim 4.5. <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarına ait plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüleri	59
Resim 4.6. <i>E. coli</i> suşlarına ait plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	60
Resim 4.7. <i>E. coli</i> ve <i>Acinetobacter</i> suşlarına ait plazmit DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüleri	61
Resim 4.8. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşların AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri	62
Resim 4.9. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	63
Resim 4.10. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	64
Resim 4.11. GSBL (+) <i>Acinetobacter</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	64
Resim 4.12. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	65
Resim 4.13. GSBL (+) <i>E. coli</i> suşlarının AO’lu ve AO’suz agaroz jel elektroforez görüntüleri	66

Resim	Sayfa
Resim 4.14. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO'lu ve AO'suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	67
Resim 4.15. GSBL (+) <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarının AO'lu ve AO'suz agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	68
Resim 4.16. AO uygulanan ve uygulanmayan <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> suşlarının ÇDST sonuçları	70
Resim 4.17. TEM ve SHV primerleriyle pozitif reaksiyon veren <i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> suşları	73
Resim 4.18. TEM ve CTX-M primeri ile pozitif reaksiyon veren <i>E. coli</i> suşları	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
Bç	Baz çifti
β	Beta
°C	Santigrad derece
Da	Dalton
dk	Dakika
λ	Lambda
g	Gram
kb	Kilobaz
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
M	Molar
nm	Nanometre
N	Normal
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
rpm	Devir sayısı
sn	Saniye
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama****AMC**

Amoksisilin-Klavulonik Asit

AO

Akridin Oranj

API

Analitik Profil İndeks

ATM

Aztreonam

CAZ

Seftazidim

CRO

Seftriakson

CTX

Sefotaksim

ÇDST

Çift Disk Sinerji Testi

DNA

Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA

Etilen Diamin Tetra asetikasit

GSBL

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

PBP

Penisilin Bağlayan Protein

PZR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SDS

Sodyum Dodesil Sülfat

UV

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin enfeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sorun olmaya başlamıştır [1]. Bakterilerin antimikrobik ilaçlara karşı gösterdiği dirençte en sık kullandıkları mekanizmalardan birisi, sentezlenen enzimler ile ilacın aktifliğinin giderilmesidir. β -laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden β -laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örnektir [2].

Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler beta-laktamaz enzimleri tarafından hidroliz edilerek etkisiz şekle dönüştürülmektedir. En az 340 farklı beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır ve en önemli enzim grupları plazmitle kodlanan sefalosporinaz, metallo-beta-laktamaz ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)' lardır [3].

GSBL'ler, Gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir [4]. İlk olarak 1983 yılında Avrupa'da *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde tanımlanan bu enzimler, daha sonra *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde de gösterilmiştir [5]. GSBL'ler çoğunlukla TEM ve SHV türevi enzimler; bazı oksasilini hidroliz eden (OXA) enzimler, CTX-M ve AMC-tip beta-laktamaz enzimleridir [6].

GSBL taşıyan bakteriler tüm dünyada yayılmayı sürdürdüğü için antibiyotik tedavilerinin planlanmasında etkenin GSBL pozitif olup olmadığı bilinmelidir. Bunun için çeşitli testler geliştirilmiştir. GSBL üreten kökenlerin saptanmasında çift disk sinerji testi (ÇDST), E-testi ve üç boyutlu test gibi değişik yöntemler kullanılabilir. Moleküler tanı yöntemleri kullanılarak GSBL'lerin ayırıcı tanımlanması yapılabilir. Moleküler teknikler GSBL alt tiplerinin tam olarak ayrılması için gerekli olup yalnızca araştırma amaçlı kullanılmaktadır [3, 4].

Bu alışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının çift disk sinerji testiyle saptanması, akridin oranj ile bu varlığın plazmit veya kromozomal kökenli olup olmadığının araştırılması, moleküler tanı yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile TEM, SHV, CTX-M ve OXA tipi GSBL'lere ait suşların belirlenmesi, PZR ve çift disk sinerji testi yöntemlerinin GSBL pozitifliği açısından güvenilirliğinin kıyaslanması ve son olarak PZR sonuçlarında farklı bir tip olduğu düşünülen enzimlerin dizi analizi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Antibiyotiklere karşı artan direnç sorunu bütün dünyayı tehdit etmektedir. Küresel bir sorun haline dönüşen direnç Gram negatif bakterilerde özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı ile kendini göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde rasyonel olmayan antibiyotik kullanımı ve kişisel hijyen kurallarına uyulmaması nedeniyle direnç sorunu gittikçe artmaktadır [7].

Bakteriler beta-laktam antibiyotiklere en sık beta-laktamaz enzimlerini üreterek direnç geliştirirler. Bu enzimler kromozomal veya plazmit kökenli olabilirler ve kolaylıkla yayılabilirler. Bu direnç genlerinin seçilmesi ve yayılması için en uygun yer antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı hastanelerdir. GSBL oluşturan suşlarla hastane enfeksiyonu epidemileri oluşabilmekte ve bu suşlar genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide sorunlar yaşanabilmektedir [8].

GSBL üreten bakterilerle enfeksiyon riskini arttıran çeşitli faktörler; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz ve diğer kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi faktörlerdir [4].

2.1. Beta-Laktamazların Genel Özellikleri

Beta-laktamazlar en çok Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen, nükleotit dizilerinden dolayı penisilin bağlayıcı proteinlerden türediğine inanılan ve beta-laktam halkası taşıyan antibiyotiklere (penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikler) karşı dirence neden olan enzimlerdir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerin beta-laktamaz ailesindeki enzimlerden biri veya birkaçı tarafından etkinliği giderilebilir [9, 10].

Beta-laktamazlar, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerce üretilmelerine karşın beta-laktamaz yapımı başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizmadır [9].

İlk beta-laktamaz tıbbi uygulamalarda penisilin kullanımının yaygınlaşmasından önce *Escherichia coli* bakterisinde tanımlanmıştır. Bu enzimler peptidoglikan tabakada bazı fizyolojik rollere sahip olabilir veya çevresel bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen beta-laktamlara karşı bakteriyi korumak amaçlı oluşabilirler [11]. Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından 350'ye yakın farklı beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır [12].

2.2. Beta-Laktamazların Hücredeki Yeri ve Sentezi

Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar bol miktarda üretilir ve ekzoenzimler olarak dış ortama salgılanır. Bu bakterilerin enzimleri genellikle indüklenebilir nitelikte olup ortamda antibiyotik varsa sentezlenir. Gram negatif bakteriler ise daha az miktarda, ancak çok sayıda beta laktamaz türü üretirler ve beta laktamaz enzimlerini periplazmik aralığa salgırlar. Gram negatif bakterilerde beta-laktamazların bir kısmı indüklenebilir, bir kısmı da konstitütif yapıda olup ortamda antibiyotik olsa da olmasa da enzim sentezi devam eder. Dolayısıyla az miktarda enzim bile, antibiyotiklerin sitoplazmik membrana bağlı penisilin bağlayan proteinlere ulaşmalarından önce etkisiz hale getirilmesini sağlar [13, 14, 15].

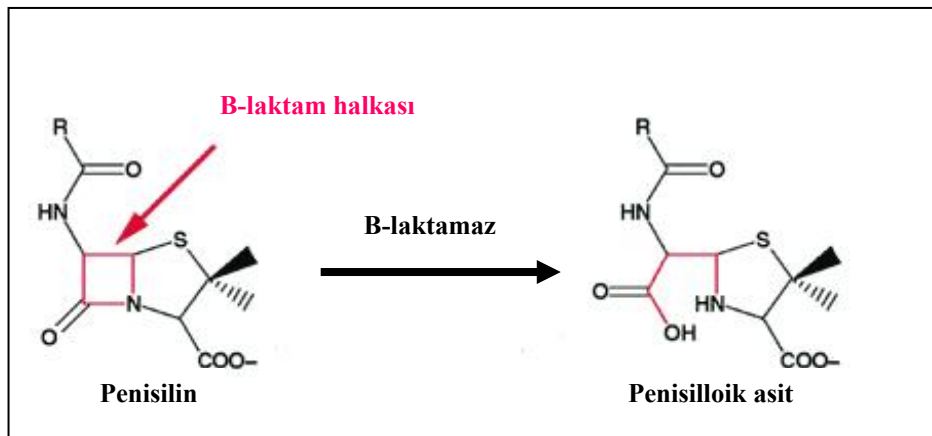
2.3. Beta-Laktamazların Taşınma Şekli

Beta-laktamazların sentezi ya *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde olduğu gibi kromozomal ya da *Staphylococcus aureus* ve *Aeromonas hydrophila* bakterilerindeki gibi plazmit kaynaklı olabilir. Plazmitler, bakteriyel direncin yayılmasının esas nedenidir. Çünkü Gram negatif bakteriler arasında konjugasyonla ve Gram pozitif bakteriler arasında bakteriyel virüsler ile bunlar taşınabilir. Bu taşınabilirlik, uygun enfeksiyon kontrol ölçümü hastane ortamlarında bozulduğunda direncin yayılmasından sorumludur [14].

2.4. Beta-Laktamazların Etki Mekanizmaları

Beta laktam grubu antibiyotikler, bakterilerin peptidoglikan (murein) tabakasının sentezini bozarak etki ederler. Bu tabaka N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu ile birleşmeleri sonucu oluşur. Transpeptidaz reaksiyonu oluşturan enzimlere *penisilin bağlayan proteinler (PBP)* adı verilir. Bunlar beta-laktam antibiyotiklerin temel hedefidir. Beta-laktam antibiyotiklerin yapısı ve uzaydaki konfigürasyonları D-alanin D-alanin molekülüne çok benzediğinden, beta-laktam antibiyotikler PBP ile reaksiyona girip D-alanin D-alanin molekülünün yerini alarak transpeptidasyonu engeller. Böylece hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm meydana gelir [16].

Beta-laktamazlar, antibiyotikleri hedef bölgesine erişmeden beta-laktam halkasını hidroliz ederek etkisiz hale getirirler (Şekil 2.1) [14, 15]. Bu enzimler, beta-laktam halkasındaki amid bağı parçalarlar. Substratları olan antibiyotik ile karşılıklı etkileşerek kompleks bir ara ürün oluştururlar. Daha sonra bu kompleks su ile hidroliz 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 [9, 17, 18].



Şekil 2.1. Penisilin direncinin sağlanması: Beta-laktamaz, molekülü etkisiz hale getirmek için penisilinin beta-laktam halkasındaki bağı kırar. Bu enzime sahip bakteri penisilinin ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin etkilerine direnç gösterir [19]

2.5. Beta-Laktamazların Sınıflandırma Şeması

Birçok araştırmacı tarafından çeşitli sınıflandırma şemaları öne sürülmüştür. 1973 yılında ortaya atılan Richmond ve Sykes şeması substrat profilini temel almıştır. Richmond ve Sykes şemasının Sykes ve Mathew (1976) tarafından genişletilmesi izoelektrik fokuslama ile ayırma dayanmaktadır. 1981’de Mitsunashi ve Inoue tarafından önerilen şemada sefüroksimi hidroliz eden beta-laktamaz kategorisi penisilinaz ve sefalosporinazı sınıflandırılmasına eklemiştir. Bush (1989) tarafından önerilen düzenleme, substrat korelasyonuna ve moleküler yapıyla inhibitör özelliklere dayandırılmıştır. Buna rağmen, sayı ve enzim çeşitliliği şemanın sınırlarının ötesinde artmıştır [20]. Bu sınıflandırmalar içinde en çok ikisi tercih edilmektedir. Bunlardan birincisi Bush ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Substrat profilleri ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temel alınarak enzimler 4 grupta toplanmıştır (Çizelge 2.1). Ambler tarafından yapılmış olan ikinci sınıflandırma ise enzimleri kodlayan nükleotit dizilerine dayanan moleküler sınıflandırmadır [2]. 1995’te, Bush-Jacoby-Medeiros en son sınıflandırma planını dört grupta ve takiben alt gruplarda göstermişlerdir [21].

Grup 1: Moleküler sınıf C’ye ait klavulanik asit tarafından inhibe olamayan sefalosporinazları içerir [21].

Grup 2: Orijinal TEM ve SHV genlerini gösteren moleküler sınıf A ve D’ye ait, klavulonik asit tarafından inhibe edilen penisilinazlar ve sefalosporinazlardır. TEM ve SHV kökenli beta-laktamazlar artan sayıda olmasından dolayı bunlar iki alt sınıfa (2a ve 2b) ayrılmıştır [21].

Altgrup 2a: Sadece penisilinazları içerir. Buna rağmen 2b, penisilinleri ve sefalosporinleri aynı oranda aktifliğini giderme yeteneğinde olan geniş spektrumlu beta-laktamazlardır. Ayrıca yeni alt-altgruplar, altgrup 2b’den ayrılır [21].

Altgrup 2be: *e* harfî geniş spektrumlu aktiviteyi gösterir. Monobaktamların yanında (aztreonam) üçüncü kuşak sefalosporinlerin aktifliğini gideren GSBL'leri temsil eder [21].

Altgrup 2br: *r* harfiyle klavulonik asit ve sulbaktama bağlanmanın azaldığı gösterilmektedir. Bu altgrup aynı zamanda inhibitör dirençli TEM kökenli enzimler olarak isimlendirilirler. Buna rağmen hala tazobaktama duyarlıdırlar [21].

Altgrup 2c: Bu enzimler kloksasilin üzerindeki bazı etkileri ile karbenisilinin benzilpenisilinden daha fazla aktifliğini giderdikleri için Grup 2b'den ayrılmışlardır [21].

Altgrup 2d: Karbenisiline karşı bazı etkinlikler ile kloksasilinin benzilpenisilinden daha fazla aktifliğini giderirler. Bu enzimlerin klavulanik asit tarafından yetersiz olarak aktiflikleri giderilir. Altgrup 2d'nin bazı enzimleri GSBL'lerdir [21].

Altgrup 2e: Monobaktamları da hidroliz edebilen sefalosporinazlardır ve klavulonik asit tarafından engellenirler [21].

Altgrup 2f: Grup 3'deki çinko kaynaklı karbapenemazlara zıt olan serin kaynaklı karbapenemazlar olduğu için ilave edilmiştir [21].

Grup 3: Çinko kaynaklı veya metallo beta-laktamazlardan oluşurlar. Moleküler sınıf B'de bulunurlar ve metal iyonu çinko ile etki eden tek enzimlerdir. Bunlar karbapenemleri, penisilinleri ve sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Bu yüzden karbapenemler hem grup 2f (serin kaynaklı mekanizma) hem de grup 3 (çinko kaynaklı mekanizma) tarafından engellenirler [21].

Grup 4: Klavulonik asit tarafından engellenmeyen penisilinazları içerir ve henüz uygun bir moleküler sınıfa sahip değildir [21].

Moleküler Sınıflandırma

Beta-laktamazların moleküler sınıflandırması bu enzimlerdeki nükleotit ve amino asit dizilerine dayanır. Bugüne kadar fonksiyonel sınıflandırma ile ilişkili olarak dört sınıfı (A-D) tanımlanmıştır. Sınıf A, C ve D serini temel alan mekanizma aracılığıyla hareket ederken, sınıf B veya metallo beta-laktamazlar aktivasyonları için çinkoya ihtiyaç duyarlar. GSBL'lerin çoğu 29 000 Da ağırlığındadır. Aktif bölgelerinde serin taşırlar. Öncelikli olarak penisilinleri tercih eden Ambler moleküler sınıf A'ya ait enzimlerdir [21].

Çizelge 2.1. Ana beta-laktamaz gruplarının fonksiyonel ve moleküler özellikleri [21]

Fonksiyonel Grup	Ana altgrup	Moleküler sınıf	Fonksiyonel Grupta Beta-Laktamazların Özellikleri
1		C	Gram negatif bakterilerdeki sıklıkla kromozomal olan enzimlerdir fakat plazmitle de kodlanabilirler. Karbepenemler hariç beta-laktamların bütün sınıfına direnç sağlarlar. Klavulonik asit tarafından engellenmezler.
2		A, D	Çoğu enzim klavulonik asit tarafından engellenir.
	2a	A	Stafilokok ve enterokokal penisilinazları kapsarlar. Penisilinlere direnç sağlarlar.
	2b	A	Başlıca Gram negatif bakterilerde TEM-1 ve SHV-1'i içeren GSBL'lerdir.
	2be	A	Oksiimino sefalosporinler ve monobaktamlara direnç gösteren GSBL'lerdir.
	2br	A	İnhibitöre dirençli TEM (IRT) tipi beta-laktamazlar ile bir inhibitöre dirençli SHV türevlerini içerirler.
	2c	A	Karbenisilini hidroliz eden enzimlerdir.
	2d	D	Kloksasillini (oksasilin) hidroliz eden enzimlerdir. Klavulonik asit tarafından etkili şekilde engellenirler
	2e	A	Klavulonik asit tarafından engellenen sefalosporinazlardır.
	2f	A	Klavulonik asit tarafından engellenirler. Aktif kısımlarındaki serin aminoasitleri karbepenemi hidroliz eder.
3	3a, 3b, 3c	B	Monobaktamlar hariç tüm beta-laktam sınıfları ve karbepenemlere direnç sağlayan metallo beta-laktamazlardır. Klavulonik asit tarafından engellenmezler.
4			Diğer gruplara uymayan çeşitli dizileri çıkarılmamış enzimlerdir.

2.6. Beta-Laktamazların İsimlendirilmesi

Beta-laktamazların isimlendirilmesindeki farklı yaklaşımlar, bu enzimleri göründüklerinden daha karmaşık bir hale getirmiştir. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları genlerine (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bazıları da bulan kişilere göre (HMS) isim almışlardır. Buna karşın, bunlardan bazıları geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin SHV *sulphydryl variable*'dan kısaltılmıştır, buna karşın artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfhidril değil, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas* bakterisinden izole edilmiş olan PSE enziminin artık enterobakterilerde de bulunabildiği bilinmektedir. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitör rezistan) gibi tanımlayıcı isimler verilmiş ve bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise, TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM 26, TEM 43 gibi numara ile belirtilmesidir [2].

2.7. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Genel Özellikleri

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, plazmit kaynaklı sınıf A TEM ve SHV türevli enzimler gibi, kodlanan enzimlerdeki tek veya çoklu aminoasit değişiklikleriyle sonuçlanan yapısal genlerindeki mutasyonlar ile gelişmektedirler. Bu enzimler, sıklıkla *Enterobacteraceae* familyasının üyelerinde, başta *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere sefalosporinler ve monobaktamlara karşı dirençe sebep olurlar [22, 23]. GSBL'ler oksiiminosefalosporinleri etkisiz hale getirirler ve GSBL üreten organizmalar sıklıkla amiloglikozidler ve fluroquinolonlar gibi belki de piperasilin-tazobaktam ve sefepim gibi diğer antibiyotik sınıflarına karşı direnç faktörlerine sahiplerdir [24]. Genelde TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri ilk penisilinlere yüksek seviyeli, birinci kuşak sefalosporinlere düşük seviyeli direnç gösterirler. Üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonamın yaygın kullanımının GSBL'lerin oluşumuna sebep olan mutasyonların esas sebebi olduğuna

inanılmaktadır. Bu enzimler sefotaksime, seftazidime ve diğer geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam gibi monobaktamlara karşı dirençte aracılık etmektedirler. Fakat sefamisin ve imipeneme karşı saptanabilir bir aktiviteye sahip değildirler. Bu enzimler oldukça genişlemiş substrat dağılımlarından dolayı *genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar* olarak isimlendirilirler [20].

GSBL'ler genelde bir veya daha fazla baz değişikliği ile TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazlardan veya CTX-M olarak adlandırılan hızlıca değişen bir sınıftan elde edilir. İlk bilinen GSBL üreten organizma Almanya'da bir hastada 1983 yılında rapor edilen *K. pneumoniae* izolatıdır. Merak uyandıran bir şekilde GSBL'ler en çok *K. pneumoniae* suşlarında belirlenmektedir. Son yirmi yılda, GSBL üreten bakteriler büyük epidemik salgınlara neden olmuştur. Bu konuda Amerika Birleşik Devletleri dahil tüm dünya ülkelerinden birçok vaka rapor edilmiştir [6, 11, 25-27].

2.8. GSBL Tipleri ve Bakteriyel Türler

GSBL'ler Türkiye de dahil bütün dünyada geniş bir oranda bulunmakta ve ciddi bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. GSBL'lerin çoğu TEM veya SHV türevidirler [20]. Şu an tanımlanan GSBL'lerin toplam sayısı 200'den fazladır. Bunlar George Jacoby and Karen Bush tarafından takdim edilen GSBL'lerin sınıflandırılmasında yetkili web sayfasında ayrıntılı olarak verilmiştir (www.lahey.org/studies/webt.asp) [11, 26].

SHV Tipi GSBL'ler

SHV tipi GSBL enzimleri klinik izolatlarda GSBL'lerin diğer tiplerine göre daha sık bulunabilir [20]. Bu tip GSBL enzimler dar spektrumlu sefalosporini hidroliz eden enzimden (SHV-1) tek bir aminoasit değişikliği ile oluşurlar [28]. SHV-1 beta-laktamazı en yaygın olarak *K. pneumoniae* bakterisinde bulunur ve bu türde plazmit kaynaklı ampisilin direncinin %20'den daha fazlasından sorumludur. SHV tipi enzim dünya çapında 50'den fazla tanımlanmıştır [11].

Son 20-25 yıldır, SHV-2'den SHV-26'ya kadar isimlendirilen SHV tipi GSBL enzimleri tanımlanmıştır (www.lahey.org/studies/webt.html) [28].

SHV tipi GSBL'ler *Enterobacteraceae*'de yaygın olarak belirlenmiştir [27]. Bunlar *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella ozaenae*, *Acinetobacter spp.*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter diversus*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia* bakterilerinde bulunabilmektedir [11, 28-30].

TEM tipi GSBL'ler

TEM tipi GSBL'ler TEM-1 ve TEM-2'den kökenlenirler. TEM-1 ilk olarak Atina'da Temoneira (bu yüzden TEM olarak isimlendirilmektedir) adlı bir hastanın *E. coli* izolatından 1965'te rapor edilmiştir [20]. *E. coli* bakterisinde ampisilin direncinin %90'dan fazlası TEM-1 üretimine bağlıdır. Bu enzim aynı zamanda *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*'de artan sayıda görülen penisilin ve ampisilin direncinden sorumludur. TEM-1, penisilinleri ve sefalotin ve sefaloridin gibi birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilir. TEM-2 (TEM-1'in ilk türevidir) orijinal beta-laktamazdan tek bir aminoasidin değişimiyle oluşmuştur [30].

Fransa'da 1984'ün erken döneminde belirlenen *K. pneumoniae* izolatlarının sefotaksime karşı arttırılmış aktivitesinden dolayı orijinal olarak CTX-1 olarak isimlendirilen plazmit kaynaklı yeni bir beta-laktamaz taşıdığı bulunmuştur. Bu enzim (şu an TEM-3 olarak adlandırılmıştır) iki aminoasidin yer değiştirmesiyle TEM-2'den farklılık göstermektedir. TEM tipi beta-laktamaz sayısı 100'den fazladır ve bunların çoğu da GSBL'dir [11].

TEM tipi GSBL, *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında bulunmasına rağmen artan sıklıkla Gram negatif bakterilerin diğer türlerinde de saptanmıştır. Bunlar; *M. morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* ve

Salmonella spp. izolatlarıdır. İlâveten TEM tipi GSBL'ler, *P. aeruginosa* gibi *Enterobacteraceae* olmayan diğêr familyalarda da bulunmaktadır [11].

2007 yılında İtalya'da yapılan bir çalışmada, *Acinetobacter baumannii* izolatının TEM-92 tipi GSBL ürettiğı rapor edilmiştir [31].

CTX-M Tipi GSBL'ler

Almanya'da 1989'un başlarında Bauernfeind ve arkadaşları, TEM ve SHV olmayan GSBL üreten, CTX-M olarak adlandırılan sefotaksime karşı hidrolitik aktivitesi olan enfeksiyonları sefotaksim tedavisine direnen *E. coli* suşları rapor etmişlerdir [32]. Bu enzimler TEM ve SHV beta-laktamazlar ile yaklaşık olarak sadece %40 oranında benzedikleri için TEM ve SHV tipi enzimlerle çok yakından ilişkili değıldirler [30].

CTX ismi bu beta-laktamazların sefotaksime karşı güçlü hidrolitik aktivitesini gösterir. Bu enzimler sefalotini benzilpenisilinden daha iyi hidroliz eder. Bu enzimler ayrıcalıklı şekilde seftazidimden fazla sefotaksimi hidroliz ederler [11].

CTX-M tipi beta-laktamazların sayısı hızla artmaktadır. CTX-M enzimleri aminoasit dizi benzerliğı ile alt sınıflara ayrılabilir. Filogenetik çalışmalar CTX-M enzimlerinin beş esas gruba ayrıldığını göstermektedir [33]. Yunsong Yu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CTX-M-3 ve CTX-M-14 en yaygın tipler olarak bulunmuştur [34]. 40'dan fazla CTX-M varyantları güncel olarak bilinmektedir. Bunlar *Salmonella spp.*'yi içeren farklı *Enterobacteraceae*'de bulunmaktadır [11]. CTX-M enzimleri *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter amalonaticus* ve *A. baumannii* bakterilerinde rapor edilmiştir [31, 32, 35-37].

OXA Tipi GSBL'ler

OXA tip beta-laktamazlar oksasilini hidroliz etme yeteneğinden dolayı bu isimlendirmeyi almışlardır. Bu beta-laktamazlar (moleküler sınıf D, fonksiyonel grup 2d) oksasilin ve kloksasilini benzilpenisilinden %50 daha fazla hidroliz ederler.

Bunlar baskın olarak *P. aeruginosa* bakterisinde oluşmaktadır fakat diğer birçok Gram negatif bakteride de belirlenmiştir. Gerçekte, en yaygın OXA tipi beta-laktamaz, OXA-1 *E. coli* izolatlarında %1-10 arası bulunmaktadır [29, 30].

OXA-tipi GSBL'ler OXA-10 beta-laktamazdan (OXA-11, -14, -16 ve -17) kökenlenmektedir. OXA-14, OXA-10'dan sadece bir, OXA-11 ve OXA-16'dan iki, OXA-13 ve OXA-19'dan dokuz aminoasit ile farklılık göstermektedir [38].

OXA tipi GSBL'ler ilk başta Türkiye Ankara'da tek bir hastaneden izole edilen *P. aeruginosa*'da keşfedilmiştir [12, 39]. Fransa'da OXA-10'un yeni bir türevi (OXA-28 olarak numaralandı) *P. aeruginosa* izolatında bulunmuştur. GSBL OXA tipi beta-laktamazların gelişimi SHV ve TEM tipi GSBL'lerin gelişimiyle birçok benzerliğe sahiptir. Ne yazık ki, OXA-tipi GSBL'lerin coğrafik yayılışına yönelik çok az epidemiyolojik veri vardır [29].

İnhibitörlere Dirençli Beta-Laktamazlar

Beta-laktamaz inhibitörleri klinikte kullanılmaya başlandıktan sonra 1997 yılından itibaren bazı amoksisilin-klavulonik aside dirençli *E. coli* bakterileri bildirilmeye başlanmıştır. İnhibitörlere dirençli olan beta-laktamazlar, üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz edememelerine karşın TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'ler ile 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 *C. freundii*'de de bildirilmektedir [30, 40, 41, 42].

Diğer GSBL'ler

Plazmit veya transpozonla ilişkili sınıf A enzimler olan çeşitli diğer beta-laktamazlar son zamanlarda keşfedilmiştir. Bunlar bilinen her beta-laktamazın basit nokta mutasyonları değildirler. Coğrafik çeşitlilikleri ile karakterize edilmektedirler [11].

PER Tipi GSBL'ler

PER tipi GSBL'ler bilinen TEM ve SHV tipi GSBL'ler ile sadece %25-27 arası benzerlik gösterirler. PER-1 beta-laktamaz etkili şekilde penisilinleri ve sefalosporinleri hidroliz eder ve klavulonik asit inhibisyonuna duyarlıdır [11].

Genişletilmiş dirençli *Pseudomonas* (PER-1) ilk kez Fransa'da *P. aeruginosa* suşunda bulunmuş ve daha sonra sırasıyla; Türkiye ve İtalya'da *Acinetobacter spp.* ve *P. aeruginosa* izolatlarında belirlenmiştir [39]. PER-1 GSBL üreten *A. baumannii* suşları Türkiye, Kore ve Fransa'dan rapor edilmiştir. PER-1 ile %86 benzerlik gösteren PER-2, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. mirabilis* ve *Vibrio cholera O1*'de belirlenmiştir. [11, 43].

VEB Tipi GSBL'ler

VEB-1, PER-1 ve PER-2 ile en fazla benzerlik (%38) gösteren GSBL'lerdir. Klavulonik asit tarafından tersine çevrilen seftazidim, sefotaksim ve aztreonama karşı yüksek seviyede direnç gösterirler. VEB-1 Vietnam'da bir *E. coli* izolatında ilk olarak tespit edilmiştir. Aynı beta-laktamaz *K. pneumoniae*, *E. cloaca* ve *P. aeruginosa* izolatlarında Tayland'da bulunmuştur. Diğer VEB enzimleri aynı zamanda Çin ve Kuveyt'te belirlenmiştir [11]. VEB-1'i kodlayan genin plazmit kaynaklı olduğu bulunmuştur. Böyle plazmitler aynı zamanda beta-laktam olmayan antibiyotiklere karşı da direnç göstermektedirler [29].

GES tipi GSBL'ler

GES tipi GSBL'ler Ambler sınıf A içindedirler fakat farklı substrat özgünlüğüne sahiptirler. Fransa'da *K. pneumoniae* izolatında belirlenen GES-1 sefoksitine karşı aktivite gösterirken, Güney Amerika'da *P. aeruginosa*'da saptanan GES-2 imipenemi etkilemektedir. Son zamanlarda GES tipi GSBL'lerin birkaç kökeni Yunanistan ve Japonya'da izole edilmiştir [44].

Diğer *Enterobacteraceae*'de bulunan nadir GSBL'ler BES, SFO, IBC, TLA, Japonya'da TOHO-1 ve TOHO-2 sayılabilir [11, 29].

2.9. GSBL Saptama Yöntemleri

GSBL saptama yöntemleri ikiye bölünebilir:

- Fenotipik yöntemler
- Moleküler yöntemler [20].

2.9.1. Fenotipik yöntemler

Bu yöntemler, oksiminino-beta-laktamlara karşı (örneğin seftriakson, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam) GSBL'lerin gösterdiği direnç ve bu direnci engellemek için beta-laktamaz inhibitör yeteneğine (genellikle klavulonat) bağlıdır [20]. GSBL saptama yöntemleri, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kuralları doğrultusunda tarama ve doğrulama olmak üzere iki aşamalıdır. Tarama testinde zon çapı seftazidim için ≤ 22 mm veya sefotaksim için ≤ 27 mm veya seftriakson için ≤ 25 mm veya aztreonam için ≤ 27 mm veya sefpodoksim için ≤ 17 mm bulunursa GSBL kuşkusu duyulur. GSBL doğrulama testi olarak çift disk sinerji testi, E-test GSBL stripleri (AB Biodisk), kombine disk yöntemi, E-testi, üç boyutlu test, GSBL kartları (Vitek, bioMerieux) kullanılmaktadır [3].

GSBL Doğrulama Testleri

Çift Disk Sinerji Testi

Jarlier çift disk yaklaştırma veya çift disk sinerji 1980'lerde tanımlanan ilk belirleme testidir. Çift disk sinerji seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), seftriakson (CRO) ve aztreonamın (ATM) 30 µg antibiyotik disklerinin amoksisillin/klavulonik asit (AMC) (20µg/10µg) diskinden 30 mm uzaklıkta (merkezden merkeze) olacak şekilde plakta yerleştirilen bir disk difüzyon testidir. Etüvdeki 24 saatlik inkübasyonu

takiben, CRO, CAZ, CTX veya ATM inhibisyon zonlarında AMC diskinin doğru belirgin genişleme olması ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin engellendiği bölgenin görülmesi GSBL pozitifliği olarak kabul edilir (Resim 2.1). GSBL taşıdığı şüpheli izolatlarda, diskler arası 30 mm standart mesafe kullanımı ile sonuç negatif ise, test daha yakın diskler (örneğin 20 mm) veya daha uzak diskler (örneğin 40 mm) ile tekrarlanılabilir. Test GSBL taramada güvenli, uygun ve ekonomik bir yöntemdir [4,11].



Resim 2.1. Çift disk sinerji yöntemi. GSBL (+) suşlarda amoksisilin/klavulonik asit diskinin etrafına (20-30 mm) yerleştirilen seftazidim, sefepim, sefoksitin, aztreonam inhibisyon zon çaplarının genişlemesi [45]

Kombine Disk Yöntemi

McFarland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen CTX ve CAZ diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon,

klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm ise izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir [46].

E Test Yöntemi

Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulonik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulonik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulonik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir *fantom zon* görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir [46].

Mikrodilüsyon Yöntemi

Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulonik asit varlığında saptanır. Klavulonik asit varlığında MİK değerlerinde $\geq 3 \log_2$ (8 kat) azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir [46].

Üç Boyutlu Test

Denenecek mikroorganizma agar yüzeyine yayıldıktan sonra agarda bir yarık açılır. Yarığın içi test edilecek mikroorganizmanın üretildiği sıvı besiyeri ile doldurulur. Antibiyotik diskleri bu yarıktan 3 mm uzak olacak şekilde dizilir. Yarığa bakan tarafta inhibisyon zonunda bozulma, daralma pozitif olarak değerlendirilir [46].

Vitek GSBL

Vitek (Biomerieux, Hazlewood, MO) seftazidim veya sefotaksimin yalnız ve klavulonik asit (4µ/ml) ile kombinasyonu kullanılarak yapılan otomatize bir duyarlılık test sistemidir. Klavulonik asit ve ilaç kombinasyonunun bulunduğu kuyucuklarda, tek başına sefotaksim veya seftazidim bulunduğu kuyucuğa göre

üremenin düşmesi GSBL varlığını gösterir. Sanders ve arkadaşlarının yaptığı GSBL ürettiği bilinen *Klebsiella spp.* ve *E. coli* suşlarının kullanıldığı bir çalışmada, Vitek GSBL testinin duyarlılık ve özgüllüğünün %99 olduğu gösterilmiştir [47].

2.9.2. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler, enzimlerin tanımlanmasında laboratuvarlar için çok uygun yöntemler olmamakla birlikte araştırma maksadıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. GSBL çalışmalarının ilk zamanlarında izoelektrik noktanın belirlenmesi GSBL varlığının tespiti için genelde yeterlidir. Buna rağmen, 90'dan fazla TEM tipi beta-laktamaz ile bunların çoğu aynı izoelektrik noktaya sahip olduğundan izoelektrik nokta ile GSBL'nin belirlenmesi daha fazla mümkün değildir. Benzer bir durum GSBL'lerin SHV, CTX-M, ve OXA tipi ailelerinde de bulunmaktadır. Beta-laktamaz genlerinin ilk belirlenmesi TEM ve SHV enzimlerine özgü olan DNA problemlerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu ilk GSBL'ler TEM ailesine ait problemlerle çalışılmıştır. DNA problemlerinin kullanımı bazen oldukça yoğun iş gücü gerektirebilmektedir. Bu nedenle bu problemler GSBL ve GSBL olmayanları, TEM ve SHV tipleri arasındaki farkı ayırt edememektedir [21, 30].

Oligo Tiplendirme

Beta-laktamazların belirlenmesinde TEM-1 ve TEM-2 ayırımını yapmak için kullanılan Quелlette ve arkadaşları tarafından geliştirilen ilk moleküler yöntem *oligo tiplendirme* yöntemidir. Bu yöntemin kullanımı ile çeşitli yeni TEM varyantları birtakım klinik izolatlarda tanımlanmıştır. Bu yöntemde, zorlu hibridizasyon koşulları altında nokta mutasyonlarını belirlemek için tasarlanan oligonükleotit problemleri kullanılmakta ve bu problemler radyoizotop veya biyotin ile işaretlenmektedir. Sonradan Mabilat ve Courvalin *bla*_{TEM} genindeki altı pozisyonundaki mutasyonları belirlemek için ilave oligonükleotit problemleri geliştirmişlerdir [21, 30].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Beta-laktamazların ait olduğu enzim ailesinin varlığını belirlemek için kullanılan en yaygın ve en kolay moleküler yöntem polimeraz zincir reaksiyonudur [21, 30]. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle baz eşleşmesi yapar. Primerlerin özgün olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Art arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 2.2). Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır [48].

PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dir [48].

Kalıp DNA: Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA, plazmit ve faj DNA, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir. PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir [48].

Polimerazlar: Taq DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört

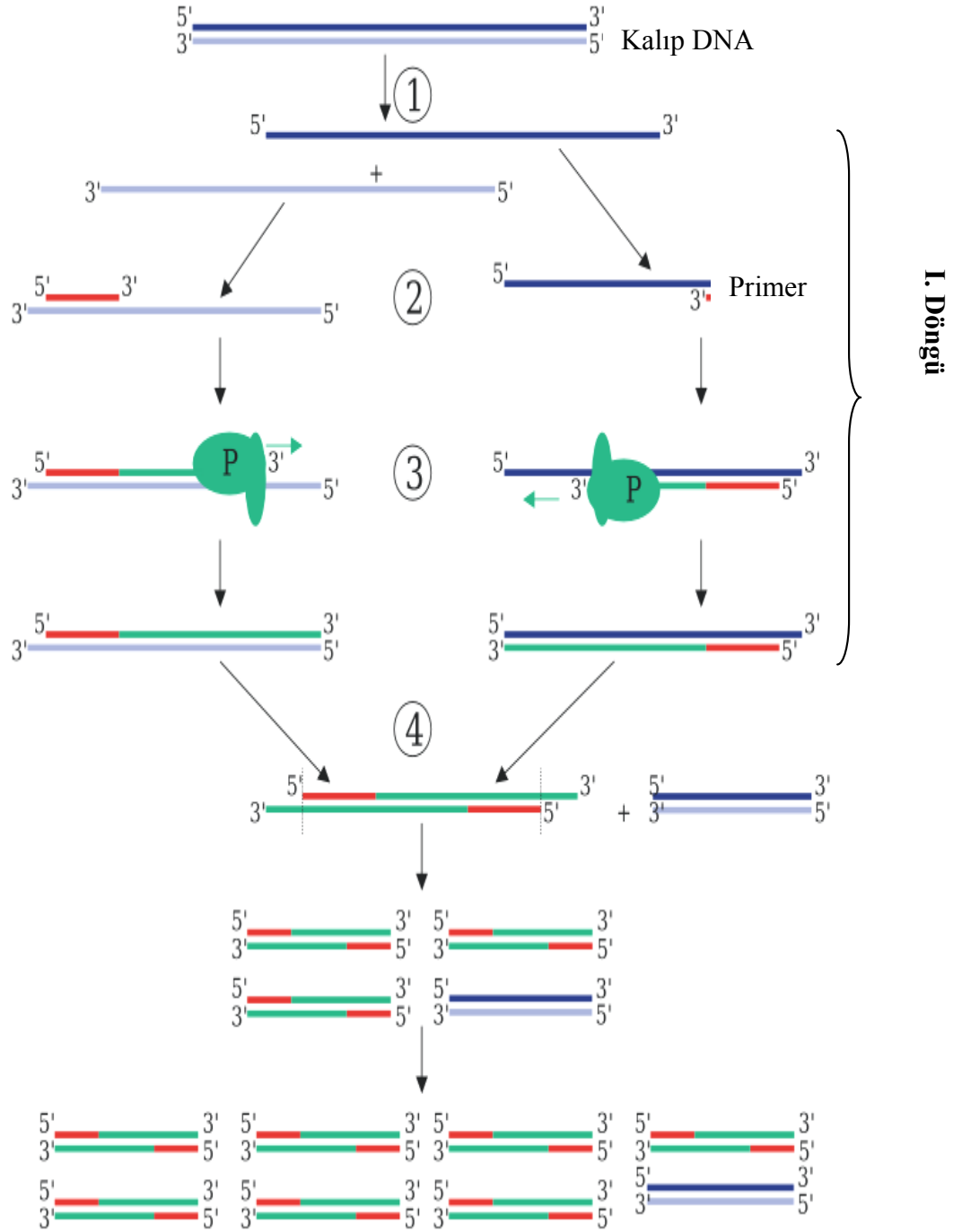
çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP ile arasına nükleotitler eklenerek, fosfodiester bağlar katalizler. Sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus* izolatından elde edilen Taq DNA polimerazdır [48].

Primerler: Gen çoğaltılması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotit primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Bu primerler genellikle oluşumu bilinmeyen çeşitli nokta mutasyonlarının olduğu bölgelere bağlanma amacıyla seçilir. Buna rağmen PZR, TEM ve SHV'nin farklı tipleri arasında ayırım yapamaz [21, 48].

dNTP Karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir [48].

Tamponlar ve MgCl₂: PZR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini¹ arttırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂'ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1,0-1,5 mM'lık değerler tercih edilir [48].

¹ T_m değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi



Şekil 2.2. PZR döngüsünün sistematik şekli 1. 96°C’de denatürasyon 2. 68 °C’de (örnek) primerin bağlanması 3. 72° C de uzama (P= DNA polimeraz) 4. İlk döngünün bitimi iki DNA ipliği diğer döngü için kalıp DNA’yı yapar DNA miktarı her bir döngü için iki katına çıkar [49]

Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP)

TEM beta-laktamaz geninin moleküler karakterizasyonuna diğer bir yaklaşım PZR'ye restriksiyon parça uzunluk polimorfizminin kullanılmasıdır. Bu denemede, çoğaltılan PZR ürünleri çeşitli restriksiyon endonükleazlar ile kesilir ve elektroforezle parçaların sayısı ve büyüklüğüne göre ayırım yapılır. Her bir restriksiyon enzimi ile oluşturulan parçaların büyüklükleri *bla*_{TEM} yapısal genindeki nokta mutasyonlarını gösterir. Birkaç farklı test SHV türevlerinin belirlenmesi ve tanımlanması için önerilmektedir. Bunların en kolayı ise PZR-RFLP yöntemidir [21].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Tek İplikli Konformasyonel Polimorfizm (PZR-SSCP)

SHV tip GSBL'leri belirlemek için kullanılan diğer yöntem PZR-SSCP analizidir [20, 30]. PZR-SSCP, ilk Orita ve arkadaşları tarafından (1989) insan genlerindeki mutasyonların belirlenmesi için tanımlanarak bu genlerin karakterize edilmesinde kullanılmıştır. PZR-SSCP, tek iplikli DNA'nın çok kısa dizilerinin elektroforetik hareketini etkileyen tek nükleotit mutasyonlarını gözlemlemeye dayanır [39]. Bu testte, 475 bp'lik bir PZR ürünü *Pst* I restriksiyon enzimi ile kesilen *bla*_{SHV} geninin kodlama dizisini içine alan primerler kullanarak çoğaltılır. Fragmentler sonra denatüre edilir ve %20'lik poliakrilamid jelde ayrılır. SHV-1,-2,-3,-4,-5 ve -7 beta-laktamaz genleri amplimerin elektroforetik modelleri ile tanımlanabilir. PZR'yi takiben Chanawong ve arkadaşları *bla*_{SHV} yapısal genindeki 11 pozisyonda 12 mutasyonu belirlemek için çeşitli restriksiyon endonükleazlar kullanmışlardır. PZR-SSCP ile PZR-RFLP kombinasyonu 17 farklı SHV geninin tanımlanmasını sağlamıştır [21, 30].

Ligaz Zincir Reaksiyonu (LZR)

LZR, nükleotit çoğaltılması amacıyla geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Bu sistem, primerlerden ürün üretmek yerine problemlerin çoğaltılmasını sağlar. PZR gibi termal döngü cihazına ihtiyaç duyulur. Sıcaklığa dayanıklı ligaz enziminin kullanıldığı LZR ile sadece iki primer boyu uzunlukta PZR ürünleri

üretir. Denatürasyon işleminden sonra, kalıp tek zincirli DNA üzerindeki hedef dizilere peş peşe yerleşen oligonükleotit problemler, yüksek sıcaklığa dirençli ligaz enzimi yardımı ile birleştirilirler (ligasyon). Ligasyona uğramış oligonükleotit çiftler ve orijinal diziler bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır. Böylece birinci döngüde iki adet kalıp DNA oluşur. Tekrarlayan denatürasyon, bağlanma ve ligasyon döngüleri sonunda milyarlarca hedef dizi üretilir. Bazı SHV türevlerinin ayırımında LZR kullanılmaktadır [50-52].

Nükleotit Dizi Analizi

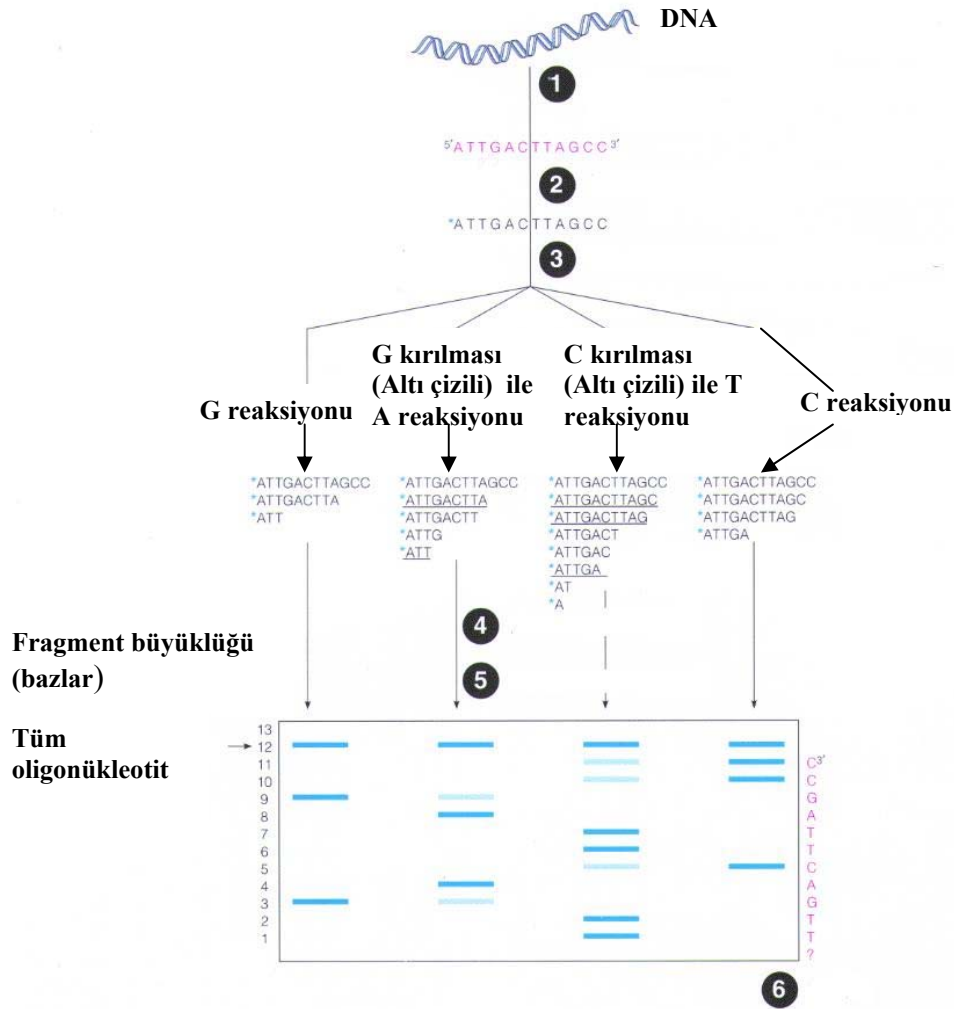
DNA dizi analizi tekniklerinden en iyi bilineni Sanger ve arkadaşlarının enzimatik yöntemi (1977) ve Maxam ve Gilbert'in kimyasal parçalama yöntemidir [53].

Sanger Yöntemi

Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve DNA polimeraz enziminin DNA molekülünü 5'-3' yönünde sentezlenmesi esasına dayanan enzimatik bir yöntemdir [54]. Bu yöntemde göre tek iplikli DNA ve bunun için yapılan radyoaktif (floresan etiketli) primer (DNA ipliği de primer de çok sayıdadır) ile her bir tüpe 4 çeşit nükleotit (ATP, GTP, CTP, TTP) ve her bir tüp için farklı bir dideoksinükleotit trifosfat (Dideoksinükleotit trifosfat bir nükleotide eklenirken, kendisine nükleotit eklenemeyeceğinden DNA sentezi herhangi bir ddNTP'nin girdiği yerde durur) eklenerek reaksiyonun her bir nükleotitin bulunduğu yerde durması sağlanır. Radyoaktif işaretli bu fragmanlar, elektroforez kullanılarak otoradyografi ile DNA'nın nükleotit dizisi belirlenir (Şekil 2.3) [55].

işaretlenir; daha sonra bu DNA molekülü uygun bir restriksiyon enzimiyle kesilerek yalnızca bir ucunda işaret kalması sağlanır. Bundan sonraki işlem; bir ucu işaretli milyarlarca DNA molekülünün dört deney tüpüne ayrılması ve her birinde G, A, T ya da C nükleotitlerini kırarak gerekli kimyasal reaksiyonun gerçekleştirilmesidir. Reaksiyon sırasında her DNA zincirinde bir ya da birkaç nükleotit kırılır. Ucunda işaret taşıyan DNA parçaları dikkate alındığında, bunların gittikçe kısalan seriler oluşturduğu görülür. Oluşturulan seriler poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak uzunluklarına göre birbirlerinden ayrılırlar ve sonuçta otoradyografi yöntemiyle gözle görülebilir duruma getirilirler. Bu sayede nükleotit dizisinin okunması mümkün olur (Şekil 2.4) [54].

Maxam Gilbert ve Sanger yöntemleri incelenirse, iki yöntemin ana prensibi tam birbirinin tersine çalışmaktadır. Maxam-Gilbert yönteminde, DNA yıkıma uğratılarak dizi tespit edilirken, Sanger yönteminde DNA polimeraz aracılığı ile sentez yapılırken dizi tespit edilmektedir [55] .



Şekil 2.4. Maxam-Gilbert yöntemiyle oligonükleotit dizileme 1. Tek iplikli homojen DNA'nın hazırlanması 2. 5' fosfat olarak P^{32} 'nin eklenmesi 3. Spesifik nükleotitlerin kırılması 4. Elektroforez 5. Otoradyografi 6. Dizinin okunması [57]

Nükleotit dizi analizi yöntemi, beta-laktamaz saptamada altın standarttır. Bu yöntemle yeni enzimler belirlenebilmekte, farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir. Yöntem pahalıdır ve uygulanabilmesi için özel cihaz gerektirir [58].

2.10. GSBL Belirlenmesinin Klinik Önemi

GSBL pozitif Gram negatif basiller, özellikle bu enzimleri üreten organizma türleri arttığı için artan bir endişedir. Bu dirençli organizmalar hastalık ve ölüm oranının artışına neden oldukları için klinik olarak önemlidirler. İlaveten, GSBL pozitif bakteriler sıklıkla enfeksiyonların tedavi zorluklarıyla sonuçlanan, birçok antibiyotik sınıfına dirençlidir. GSBL pozitif bakterilerle ilgili diğer problemler GSBL varlığını belirlemedeki zorlukları, sınırlı tedavi seçeneklerini ve klinik sonuçta sağlığa zararlı etkileri kapsamaktadır [21].

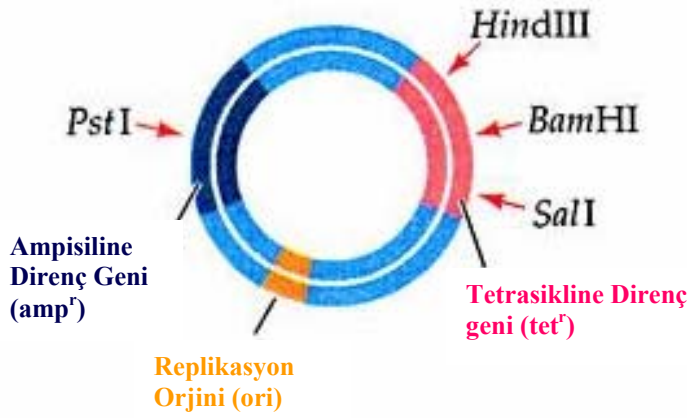
2.11. Plazmitler, Transpozonlar ve GSBL'leri Kodlayan Plazmitlerin Özellikleri

Kromozomların dışında, bakterilerin içinde bulunabilen elementlere *plazmit* adı verilir. Plazmitler bakterilerin sitoplazmasının içerisinde çift iplikli bir DNA molekülünden yapılmış, çoğu halkasal nadiren doğrusal yapıda, bakteri kromozomundan bağımsız replikasyon gösteren ve bulundukları bakterinin bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, bakteri kromozomundan küçük DNA parçalarıdır. Plazmitlerin büyüklüğü 1-2 milyon Dalton'dan (1-2 mega Dalton) 150 mega Daltona kadar değişir. Hepsinde kendi replikasyonlarını sağlayan genler ile çeşitli fenotipik karakterleri kodlayan 1-2 ile çok sayıda gen bulunur (Şekil 2.5) [59].

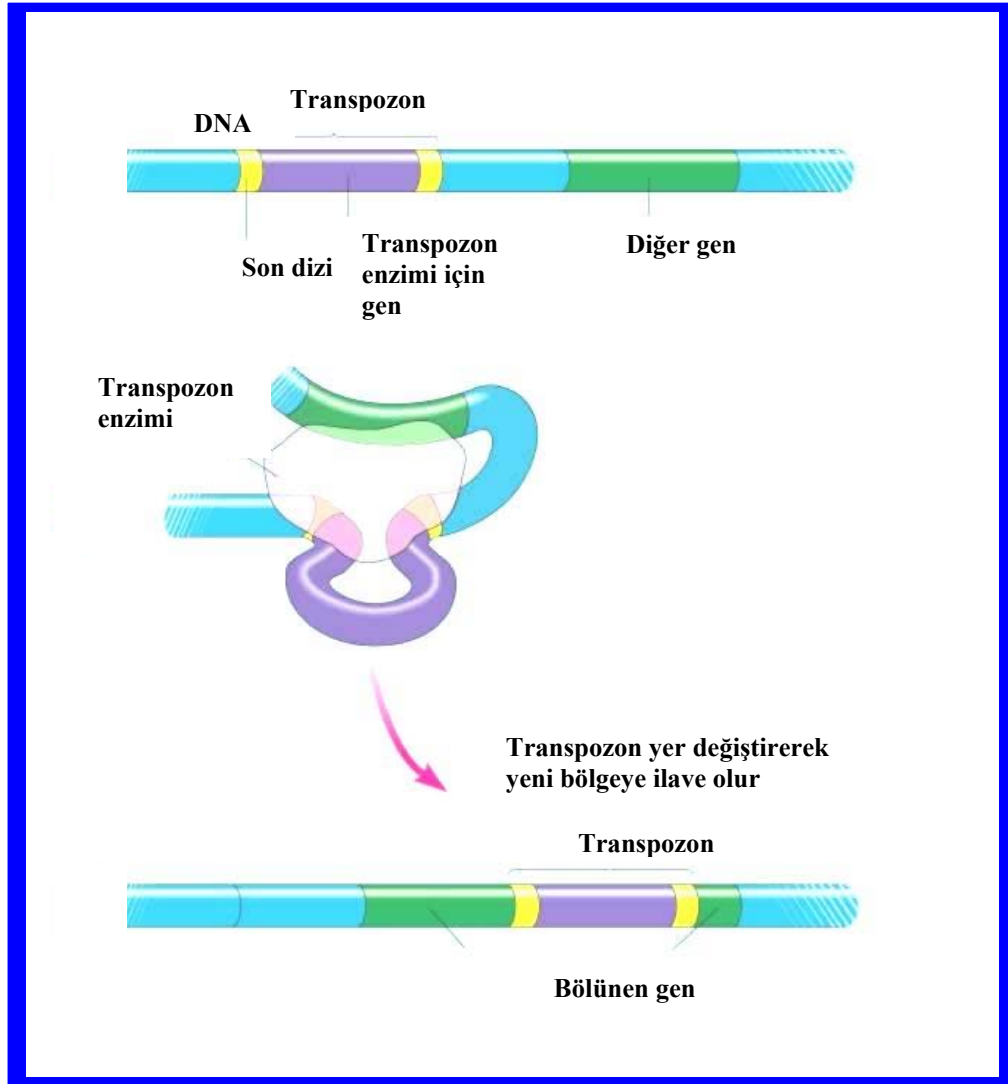
GSBL üretiminden sorumlu plazmitler, büyük olmaya eğilimlidirler (80 kb veya daha fazla) ve tedavi alternatiflerinin tasarlanmasında önemli bir kısıtlama olan çeşitli ajanlara karşı direnç taşımaktadırlar (Çizelge 2.2). GSBL üreten organizmalarda en sık çoklu direnç amiloglukozidler, fluoroquinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol ve sulfamethaksazol-trimethoprim karşı görülmektedir [20].

Bir replikon (bakteri veya plazmit DNA'sı) üzerinde bulunan, iki yanlarından zıt dizi düzenindeki yinelenmiş sıralarla palindromik düzende sınırlandırılmış ve belirli bir görevi (direnç vb.) kodlayan, zaman zaman aynı replikon üzerinde ya da replikonlar

arasında yer değiştirme yeteneğindeki doğrusal, çift ipçikli DNA parçalarına *transpozonlar* denir. Transpozonların taşıdıkları genler antibiyotiklere direnç genleri olabilir [59]. Transpozonlar kendi kendilerini replike edemezler, bu yüzden kendi kendilerini replike eden aynı zamanda geçişin aracıları olarak hizmet eden plazmit gibi genetik elementlere bağlıdırlar. Buna rağmen transpozonlar plazmitler arasında ve kromozomlar arasında hareket edebilirler (şekil 2.6) [60]. Gerçekte bazı GSBL kodlayan genlerin transpozonlara bağlı oldukları bilinmektedir. Bu yüzden bunların üretimi ifadeleri ve yayılımları için transpozonlar gereklidir [61].



şekil 2.5. pBR322 plazmiti (kırmızı okla gösterilenler restriksiyon enzimleri için tanıma bölgesidir) [62]



Şekil 2.6. Transpozon hareketi [63]

Çizelge 2.2. GSBL genlerini taşıyan plazmitlerin özellikleri [64-66]

Kısaltmalar: Cm: kloramfenikol, Gm: gentamisin, Hg: civa, Km: kanamisin, Sm: Streptomisin, Sp: spektinomisin, Su: sülfonamid, Tc: tetrasiklin, Te: potasyum tellurit, Tm: tobramisin, Tp: trimetoprim, UV: UV radyasyon, Ak: amikasin, Nm: neomisin, As: sodyum arsenit.

* Beta-laktamaz olmayan direnç genleri

** Uyumsuzluk Grubu: Bakterilerde barınma ve konjugasyon için aynı mekanizmaları kullanan iki plazmit aynı bakteride bulunamazlar, diyer bir deyişle aynı uyumsuzluk grubunda yer alırlar

Beta-Laktamaz	Plazmit Türü	Ek Dirençler*	Uyumsuzluk Grubu**	Büyüklik(Kb)
TEM-3(CTX-1)	pMG227	KmSuTcTmHg	M	85
TEM-3	pCFF04	AkKmNmSuTcTmHg	M	80
TEM-4	pUD16	GmKmNmSmSpSuTcTmTpUV	C	190
TEM-5(CAZ-1)	pCFF14	KmNmSmSuTc	F1	185
TEM-6	pMG226	CmKmNmSmAsTeUV	H12	240
TEM-7	pIF100	AkGmKmSuTcTmHg	M	90
TEM-8(CAZ-1)	pCFF34	AkKmNmSuTcTmHg	M	80
TEM-9	pMG228	CmGmSmSpSuTcTp	C	190
TEM-10	pMG223	AkCmGmKmNmSmSpSuTcTmTpHgTe	H12	285
TEM-11	pMG224	GmSuTcTmTpHg	-	68
TEM-12	pMG224	CmGmKmNmSmSpSuTcTpHgTe	H12	260
TEM-26	pMG225	CmGmKmNmSmSpSuTcTpHgTe	H12	240
SHV-2	pMG229	SmSpSuTcTp	C	205
SHV-3	pUD18	AkGmKmNmSmSpSuTcTmTpAs	F1	300
SHV-4	pUD24	AkGmKmNmSmSpSuTcTmTpAs	F1	275
SHV-5	pAFF2	GmSmSpSuTc	M	95
SHV-5	pMG242	AkKmsmSpTm	N	140

2.12. Akridinler (Priflavin, Akriflavin, Akridin Oranj) ve Akridinlerin DNA Üzerine Mutajenik Etkileri

Akridin ve türevleri DNA'ya sıkıca araya girme ile iki yönlü bağlanan düzlemsel polisiklik aromatik moleküllerdir. Genellikle sarı veya turuncu renktedirler. Araya giren ajanlar (interkalatör) kovalent bağlar oluşturmaksızın DNA içerisine dikey olarak giren moleküllerdir ve biyoaktif moleküllerin en eski ve en başarılı sınıfıdır. Akridinler geniş spektrumlu bir biyolojik aktiviteye sahiplerdir ve bunların birkaç türevi geniş çapta antibakteriyel, antikanser ve antiprotozoal ilaçlar olarak kullanılır [67, 68].

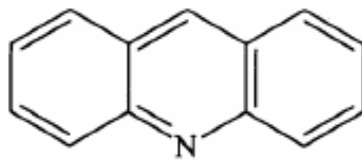
Genellikle küçük moleküllerin DNA çift ipliğine bağlanmasıyla ilgili üç bağlanma şeklinin olduğu kabul edilir. Bunlar, araya ilave edilerek bağlanma, oluk açarak bağlanma, elektrostatik bağlanmadır. Elektrostatik etkileşim DNA çift ipliğinin dış kısmı boyuncadır ve seçiciliğe sahip değildir. Araya girerek bağlanma ilk olarak 1961'de Lerman tarafından önerilmiştir ve tipik olarak araya giren küçük moleküller, bitişik iki baz çifti arasına girebilen düzlemsel bir aromatik sisteme sahiptir [38].

Akridin'lerin temel yapıları Şekil 2.7'de gösterilmektedir. Bu maddeler, genellikle (C-G) $\rightarrow$ (A-T) veya (A-T) $\rightarrow$ (T-A) şeklinde transversiyonlara yol açarak mutasyona sebep olurlar. Bu mutasyonlar bazen kendiliğinden ya da yine akridinlerin etkisiyle normale dönüşebilirlerse de diğer mutajenlerle geri dönüştürülemezler. Bir geri dönüşüm olduğu zaman, bunun mutasyonun olduğu gen içinde meydana gelen onarıcı nitelikte bir *baskılayıcı* mutasyonun sonucu gösterilebilir [69].

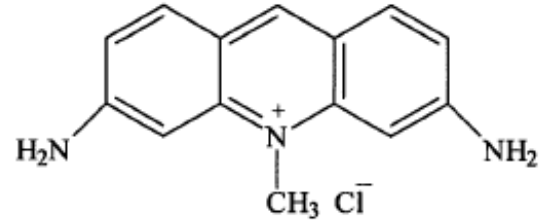
Akridin boyaları rekombinasyon esnasında bir iplikçiği kopan DNA molekülüne bağlanmakta ve iplikçiklerin onarılmasında yanlışlıklara neden olabilmektedir. Akridin mutasyonları, diğer transversiyon mutasyonlarından farklı olarak daima gen fonksiyonlarının tümüyle kaybolmasına yol açarlar. Bu mutasyonlarda, birden fazla baz çifti içeren büyük DNA segmentleri gen yapısından çıkmakta (delesyon) ya da uzun DNA segmentleri gen yapısına girmektedir (insersiyon) [69].

Akridin boyaları floresan maddelerdir. Bu boyalar, DNA moleküllerinin yapısına girerek bakterileri ve fajları görünen ışığın fotodinamik etkisine duyarlı hale getirmek suretiyle de mutajenik etki gösterebilirler (Fotodinamik etki organik maddelerin fotosentetik oksidasyonu olarak tanımlanmaktadır). Bu şekilde bir değişikliğe uğramış olan DNA molekülleri, oksijen varlığında görünen ışığın etkisiyle okside olurlar ve bu yolla da mutasyonlar oluşabilir [69].

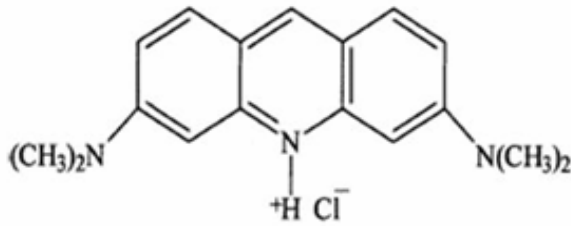
Akridin boyalarının mutasyona yol açtıkları noktalar, DNA üzerinde gelişigüzel dağılmış bulunurlar ve bunlar *sıcak noktalar* denilen yüksek oranda mutasyona uğrama eğilimi gösteren bölgeler halindedirler [69].



Akridin Halkası



Akriflavin



Akridin oranj

Şekil 2.7. Akridin boyalarının moleküler yapıları [68]

2.13. Akridin Oranj ve Kullanım Alanları

Akridin oranj (AO) düzlemsel yapısı antrasenden (katrandan çıkarılan bir karbonhidrat) köken alan temel bir boyadır. Nükleik asitler için yüksek afinite gösterir ve çift ipliğin arasına girer veya UV ışık altında sırayla 530 nm’de yeşil ışık ve 640 nm’de kırmızı ışık yayan tek iplikli nükleik aside elektrostatik olarak bağlanır. Bu özellik boyaya metakromatik özellik kazandırır [70].

AO, replikasyon üzerinde nükleotit bazlarının delesyon ve insersiyonlarına elverişli olan DNA’daki baz çiftlerinin arasına giren aromatik bir bileşiktir. Meydana gelen mutasyon mRNA kopyasında kodlanan bilginin dönüştürülmesinde değişikliğe neden olur. Bu yüzden insersiyon veya/ve delesyon noktasında aminoasit dizisinin değişimine ve ekstra-kromozomal elementlerin kaybına neden olur. *E. coli*’nin AO’ya maruz bırakılması DNA’da hızlı fakat tamir edilebilir bir hasara sebep olmaktadır. Bu yüzden AO özellikle plazmitlerin yok edilmesinde etkilidir ve sıklıkla bu amaç için kullanılır [71].

AO’nun suda düşük konsantrasyonlar da bile dimerize olduğu bilinir [70]. Floresan mikroskopunda kullanıldığı için çok tercih edilen bir boyadır [66]. Enfeksiyöz mononükleozda lenfositlerin tipik olmayan aktivasyonu, spermatogenez boyunca hücre aktifliğinin giderilmesi ve yüksek hücre yoğunluklarındaki kültürde hücre aktifliğinin giderilmesi üzerine yapılan çalışmalarda kullanışlı bir floresan mikroskop probudur [72].

AO bundan başka yaygın olarak sitometri (kan hücrelerinin sayımı) akışını izlemek için sitokimyada, nükleer parçalanmada ve biyolojik membranlardaki pH gradientleri ve diğer çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadır. Deneysel sitopatolojide, akridin oranj herpes virüsü ile enfekte edilen kültür hücrelerinde ve sonradan tek iplik içeren virüslerden çift ipliği ayırt etmek için kullanılmıştır [73].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri örnekleri

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına 8-21 Eylül 2006 ve 1-26 Mayıs 2007 tarihleri arasında başvuran ayakta ve yatarak tedavi olan hastalara ait çeşitli kültür örneklerinden elde edilen *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* izolatlarına ait 94 suş incelemeye alınmıştır.

3.1.2. Besiyerleri ve ayıraçlar

Nutrient Agar (NA) Besiyeri (Oxoid): 1g Et Özütü (beef extract), 2g maya özütü (yeast extract) 5g pepton, 5g sodyum klorür (NaCl) ve 15g agar son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Nutrient Sıvı (NB) Besiyeri (Oxoid): 1g Et Özütü, 2g Maya Özütü, 5g Pepton, 5g NaCl, pH, 0,01 N HCl ve 0,01 NaOH ile 7,8'e ayarlanarak son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Luria Bertani Sıvı (LB) Besiyeri (Oxoid): 5g Maya özütü, 10g pepton ve 10g NaCl son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Eozin Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri (Oxoid): 10g Pepton, 5g laktoz, 5g sükroz, 2g K₂HPO₄, 13,5g agar, 0,4g (%2'lik eriyikten 2 ml) eozin Y ve 0,065g (% 3,25 eriyikten 0,2 ml) metilen mavisi son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

TSI (Üç şekerli demirli) Agar Besiyeri (Oxoid): 20g Polipepton, 10g laktoz, 10g sükroz, 1g dekstroz, 5g NaCl, 0,2g ferrik amonyum sülfat, 0,2g sodyum tiyosülfat,

13g agar ve 0,025g fenol kırmızısı son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

İndol Besiyeri (Oxoid): 20g Pepton/Pankreatik kazein, 5g NaCl son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Kovaks Ayıracı: 150 ml Saf amil/izoamil alkol, 50 ml konsantre HCl, 10 gr p-dimetilaminobenzaldehit karıştırılarak hazırlanmıştır.

Metil kırmızısı/Voges proskauer Besiyeri (Oxoid): 7g Pepton, 5g glukoz, 5g K₂HPO₄ hafifçe ısıtılarak suda eritilmiştir. Süzgeç kağıdıyla süzülerek soğuduktan sonra pH'sı 6,9'a ayarlanarak son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Metil kırmızısı Ayıracı: 0,05g Metil kırmızısı önce 150 ml %95'lik etil alkolde eritilmiştir. Sonra 100 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır. Ayıraç oda sıcaklığında saklanmıştır.

Voges Proskauer Ayıracı: 5g Alfa naftol, 100 ml %100'lük etil alkol ve 10g potasyum hidroksit 100 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Simon's Sitrat Agar (Oxoid): 2g Sodyum sitrat, 5g NaCl, 0,2g MgSO₄, 1g NH₃H₂PO₄, 1g K₂HPO₄, 0,08g bromtimol mavisi ve 15g agar son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Üreli Agar (Oxoid): 1g Pepton, 5g NaCl, 2g KH₂PO₄, 1g D-Glukoz, 20g Üre, 12g fenol kırmızısı 100 ml distile su içinde eritilerek üre eriyiği hazırlanmış ve eriyik süzme işlemi ile steril edilmiştir. Daha sonra 900 ml distile su içerisine 15g agar katılmış 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. Agar 50-55 °C'ye soğutulmuş üre eriyiği de aynı derecede ısıtılmıştır. Steril olarak birbirine eklenerek deney tüplerine dağıtılıp yatık durumda katılaştırılmıştır.

%15 Gliserollü Beyin Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri (Oxoid): 27,5g Nutrient substrat (Beyin özütü, kalp özütü ve et özütü), 2g glukoz, 5g NaCl, 2,5g Na₂HPO₄ ve 15g agar karıştırılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Besiyerini %15'ini gliserollü yapmak için son hacmin %15 gliserol geri kalanı distile su olacak şekilde besiyerine ilave edilip karıştırılarak hazırlanmıştır.

Mueller-Hinton Agar (MHA) Besiyeri (Oxoid): 300g Et özütü, 17,5g kazein hidrolizat, 1,5g nişasta ve 10g agar son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Mio (Motility Indole Ornithine) Besiyeri (Oxoid): 3g Maya özütü, 10g pepton, 10g tripton, 5g L-ornithin HCl, 1g dekstroz, 2g agar ve 0,02g brom kresol moru son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su içinde karıştırılıp kaynatılarak eritilmiştir.

Çalışmada kullanılan bütün besiyerleri 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Tampon ve çözeltiler

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:* 0,2 N NaOH (taze hazırlanan 10 N stoktan) ve %1 SDS karıştırılarak hazırlanmıştır.
- *Çözelti III:* 5 M 60 ml potasyum asetat, 11,5 ml 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 çözümlenerek hazırlanmıştır.

Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Çözelti

Akridin Oranj Çözeltisi (mg/ml): Akridin oranj önce belli bir miktar suda çözülüp sonra milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve son konsantrasyon 100 ml distile suda 100 mg akridin oranj olacak şekilde hazırlanmıştır. +4 °C’de saklanmıştır.

Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50)* (pH 8.0): 242 g Tris, 57,1 ml glasiyel asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözümlenerek hacim 1000 ml’ye tamamlanmıştır.
- Agaroz*: %0,8’lik ve %2’lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözümlenerek hazırlanmıştır.
- Yükleme tamponu*: 40 gr süzkroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- Etidyum bromür*: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- *Taq polimeraz tamponu 10x*: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin karıştırılarak hazırlanmıştır.
- *MgCl₂*: 25 mM kullanılmıştır.
- *Nükleotit Karışımı*: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) kullanılmıştır.
- *Taq polimeraz*: 5 u/µl kullanılmıştır.

-Primerler: GSBL tiplerinin belirlenmesi için tasarlanan primerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. GSBL tiplerinin belirlenmesi için tasarlanan primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri

Primerler	Nükleotit Dizisi (5’-3’)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	PZR Ürünü Büyüklüğü (bp)	Gen Bank Erişim Numarası
SHV-F	CGCCTGTGTATTATCTCCCT	60	293	EF125011
SHV-R	CGAGTAGTCCACCAGATCCT	62		
TEM-F	TTTCGTGTCGCCCTTATTCC	60	403	AB282997
TEM-R	ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG	62		
CTX-M-F	CGCTGTTGTTAGGAAGTGTG	60	569	DQ303459
CTX-M-R	GGCTGGGTGAAGTAAGTGAC	62		
OXA-F	ATGGCGATTACTGGATAGATGG	64	701	L07945
OXA-R	AGTCTTGGTCTTGGTTGTGAG	62		

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin seçilmesi

İdrar, kan, balgam, beyin omurilik sıvısı (BOS), yara yeri, periton, katater, abse ve bronş lavajından alınan kültür örnekleri steril şartlarda klinisyenler tarafından hastadan alınıp laboratuvara ulaştırıldıktan sonra EMB agara (Oxoid) ekilmiş ve 37 ° C’lik etüvde üremeye bırakılmıştır. EMB agarda (Oxoid) üreyen kolonilerin koloni morfolojileri, Gram boyanma özellikleri ve biyokimyasal reaksiyonlarına bakılarak tanımlanmıştır.

3.2.2. Bakterilerin tanımlanması

Bakteriler, EMB agara tek koloni oluşturmaları için pasajlanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra saf koloniler TSI agara (Oxoid) ekilmiş ayrıca IMVIC testine

alınmışlardır. Daha sonra üreli agara (Oxoid) ve mio besiyerine (Oxoid) ekilerek adlandırılmışlardır. İzole edilen bakteriler klasik yöntemlere ek olarak Analitik Profil İndeks API 20E (Biomerieux, Marcy I' Etoile, France) ticari kitleri kullanılarak da adlandırılmıştır.

TSI agara (Oxoid) iğne öze yardımıyla alınan saf koloniler besiyerinin dik kısmına batırılmak suretiyle ekilmiş, yatık kısmının yüzeyine de zik zaklar çizilerek ekim tamamlanmıştır. Sonuçlar 37°C'de bir gece bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Bu besiyeri bakterilerin glukoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını araştırma temeline dayanmaktadır.

IMVIC test grubu İndol, Metil kırmızısı, Voges Proskauer ve Sitrat testlerinden oluşmuştur. İndol testinde, bir gece 37°C'deki inkübasyon sonunda bakteri triptofonaz enzim aktivitesine sahipse Kovaks ayırıcı damlatıldığında (2ml'ye 5 damla) indol halkası oluşturur. Halka kırmızı renkte ise indol testi pozitif, sarı renkte ise negatif olarak değerlendirilir. *E. coli* için indol testi pozitif, *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri için negatiftir [74].

Metil kırmızısı testinde bakteriler glukoz fosfatlı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda glukozu kullanarak, karışık asit fermentasyon son ürünleri nedeniyle pH 4.5'in altında asit oluşturduysa besiyerine metil kırmızısı damlatıldığı zaman (2,5 ml'ye 5 damla) besiyerinin rengi kırmızıya döner. Besiyeri kırmızı ise pozitif, sarı kalmışsa negatif olarak değerlendirilmiştir. Metil kırmızısı testi *E. coli* için negatif, *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri için pozitifdir [74].

Voges- Proskauer testinde glukoz fosfatlı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda glukoz fosfattan asetil metil karbinol oluşturmuşsa alfa-naftol (2,5 ml'ye 6 damla) ve potasyum hidroksit (2 damla) damlatıldığında besiyeri yaklaşık 20 dakika sonra kırmızıya dönüşür. Kırmızı pozitif sarı renkte kalmışsa negatif değerlendirilmiştir. *E. coli* için negatif, *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri için pozitifdir [74].

Sitrat testinde bakterilerin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığına bakılmaktadır. Besiyeri içinde bromtimol mavisi bulunmaktadır. Besiyeri yeşilden maviye dönüyorsa bakteri sitratı kullanıyor demektir ve test pozitifdir. Renk değişimi olmazsa test negatiftir. Sitrat testi *E. coli* için negatif, *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri için pozitifdir [74].

İzole edilen bakteriler TSI agara (Oxoid) ekim ve IMVIC testi sonrasında üreli agara (Oxoid) ve mio besiyerine (Oxoid) ekilmiştir. İğne öze yardımıyla alınan saf koloni besiyerlerine dik bir şekilde bir hatta batırılıp çekilmiş 37°C’de bir günlük inkübasyon sonucunda besiyerleri değerlendirilmiştir. Üreli besiyerinin (Oxoid) sarı renginin kırmızıya dönüşmesi bakterilerin üreaz aktivitelerinin pozitif olduğunu göstermektedir. Mio besiyerinde (Oxoid) ise bakterilerin hareket yetenekleri test edilmiştir. Mio besiyerine (Oxoid) yapılan çizgi ekimi sonucu bakterilerin ekim yerinin yanında bulanık olarak görülen üreme hareket özelliğini gösterir.

API test kitleri ile bakterilerin tanımlanması

API 20 E *Enterobacteraceae* familyasına ait Gram (-) bakterileri ve diğer Gram (-) bakterilerin adlandırılmasında kullanılan hızlı tanımlama sistemidir. API 20 E tanımlaması için bakteriler NA besiyerine ekilmiş ve 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler steril bir öze yardımıyla toplanarak API 20 E için içerisinde % 0,8’lik NaCl bulunan 2 ml’lik deney tüplerine aktararak süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon içerisindeki bakterilerin yoğunluğu 3 No’lu McFarland standardına eşitlenmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonları API 20 E test kuyucuklarına (strip) ekilmiştir. Stripler 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik süreler sonunda test kuyucuklarında meydana gelen renk değişimlerine göre değerlendirmeler yapılmıştır. Alınan pozitif sonuçlar bilgisayar ortamına girilerek bakterilerin tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır [75]. Bakteri suşları % 15 gliserollü beyin kalp infüzyon besiyerine inoküle edilerek -20 °C’de saklanmıştır [76].

3.2.3. Çift disk sinerji testi

Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI= eski NCCLS) önerilerine göre disk difüzyon yönteminin standartlarına uygun olarak 0,5 McFarland eşeline göre bulanıklığı ayarlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agarı yüzeyine yayıldıktan sonra merkeze amoksisilin-klavulonik asit (10+20µg) diski yerleştirilerek, çevreye merkezden uzaklığı 30 mm olacak şekilde seftazidim (30µg), sefotaksim (30µg), seftriakson (30µg) ve aztreonam (30µg) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 18-24 saat 35°C’de inkübe edilmiştir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının inhibitör diskinde doğru genişlemeleri veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bir bölgenin görülmesi GSBL pozitifliği olarak yorumlanmıştır [77, 78].

Antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zon çapının azaldığı ve sıfır olduğu durumlarda diskler merkezden 25 mm, 20 mm ve 15 mm uzaklığa yerleştirilmiş ve test tekrarlanmıştır [61].

3.2.4. Gram (-) bakterilerden plazmit DNA izolasyonu

Tanımlanan türlerin plazmit DNA izolasyonları Maniatis’in tanımladığı yöntemle yapılmıştır. İzole edilen suşlar 5ml’lik 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 çöktürülmüş ve 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 ml 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 ml 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'lar -20°C'de saklanmıştır [79].

3.2.5. 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 [79].

3.2.6. Plazmit DNA büyüklüklerinin hesaplanması

Suşların plazmit DNA büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler ağırlıkları bilinen DNA belirteçlerinin elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır. Belirteç 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 [80].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Y= Belirteç DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

A= Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmitin jel üzerindeki göçü

3.2.7. Akridin oranj ile plazmitlerin giderilmesi

Akridin oranjin (AO) damıtık su içinde yoğunluğu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra test edilecek suş sayısı (GSBL pozitif suş sayısı) kadar tüpe pH'sı 7,6 olacak şekilde 5 ml NB sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Bakteri kültürleri bir öze dolusu NB besiyerlerine ekilmiş ve 1 gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, önceki gün üreyen her bir bakteri kültürü için iki deney tüpü olacak şekilde tekrar 5ml pH'sı 7,6 olan NB besiyerleri hazırlanmıştır. İlk tüplere her bir bakteri kültüründen 500 µl alınarak aktarılmıştır. Bu tüpler kontrol tüpleri (bakteri+NB) olarak değerlendirilmiştir. İkinci NB'li tüplere ise önce stok AO çözeltisinden 250 µl alınarak aktarılmış ve daha sonra yine bakteri kültürlerinden

500 µl eklenmiştir. Bu ikinci tüpler (AO+NB+bakteri) ise esas deney tüpleri olarak değerlendirilmiştir. AO, besiyerlerine 20 ml için 1 ml olacak şekilde hesaplanarak eklenmiştir. Bakteriler tekrar 1 gece 37°C’de inkübe edilmişlerdir [69].

Ertesi gün kontrol ve esas deney tüplerinin 3 ml’si steril ependorflara aktarılarak plazmit DNA izolasyonuna alınmıştır (Maniatis). İzole edilen plazmitler % 0,8’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek AO’nun plazmitlere etkisi gözlenmiştir. Daha sonra sıvı kültürün geri kalan kısmı ÇDST’ine alınarak suşların AO’lu ve AO’suz ortamda GSBL enzimi üretimleri incelenerek suşların GSBL üretiminin plazmit veya kromozom kökenli olup olmadıkları araştırılmıştır [79].

3.2.8. Kromozomal DNA izolasyonu

Suşlar NB 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 - 20 °C’de kullanılıncaya kadar saklanmıştır [81] .

3.2.9. Primerlerin tasarlanması

Primer tasarımı için önce hedef genotipler belirlenmiştir. Daha sonra Genbank erişim numaralarına (SHV, EF125011; TEM, AB282997; CTX-M, DQ303459; OXA, L07945) ve hedef genotipleri içeren gen bankası kayıtlarına ulaşılmıştır. Bulunan dizilere önce *CLC Free Workbench* programı kullanılarak çoklu hizalama (multiple alignment) yapılmıştır. *Artemis* programında dizinin kodlanan gen bölgeleri alınarak *Perl Primer* programında her bir GSBL tipi için farklı büyüklükte PZR ürünü oluşacak şekilde 20-22 baz uzunluğunda primerler tasarlanmıştır.

3.2.10. 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 Primerin bağlanması ve uzama
72 °C' de	1 dk	
72 °C' de	3 dk	Son uzama aşaması

Elde edilen PZR ürünleri Bölüm 3.2.5 belirtildiği şekilde %2'lik agaroz jeller hazırlanarak jel üzerinde yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapılmıştır.

3.2.11. DNA dizi analizi ile GSBL tiplerinin belirlenmesi

Çalışmamızda PZR'de SHV, TEM, CTX-M ve OXA tipi GSBL'ler için tasarlanmış primer ile ürün veren örnekler ticari bir firmaya gönderilerek DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Kromatogram dosyaları şeklindeki firmanın verdiği sonuçlar açılarak *Finch TV* programı ile diziler çıkartılmış, gelen dizilerin DNA dizi veritabanları ile BLAST yazılımında karşılaştırılmaları yapılmıştır. Çoklu hizalamalar ile elde edilen dizilerin toplu karşılaştırılması da yapılarak GSBL tipleri belirlenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Bakterilerin Tanımlanması

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran yatarak ve ayakta tedavi edilen hastalardan toplam 94 adet *Klebsiella*, *Escherichia coli* ve *Acinetobacter* suşu izole edilmiştir. İzole edilen bu suşların TSI agar reaksiyonları, IMVIC test sonuçları, üreaz aktiviteleri ve hareket yetenekleri Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Bu testlerle tam olarak adlandırılmayan suşlar API 20E test kitlerinden alınan sonuçların API Software programında değerlendirilmesiyle tanımlanmıştır (Bkz. Resim 4.1). Bu tanımlama testlerine göre 94 suşun 50 tanesi (%54) *Escherichia coli*, 19 tanesi (%20) *Acinetobacter baumannii*, 17 tanesi (%18) *Klebsiella pneumoniae*, 4 tanesi (%4) *Klebsiella oxytoca*, 2 tanesi (%2) *Klebsiella terrigena*, 2 tanesi (%2) *Klebsiella ornithinolytica* olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.1. İzole edilen bakterilerin TSI agar reaksiyonları ve IMVIC test sonuçları

Bakteriler	TSI Agar Reaksiyonları					IMVIC Test Grubu			
	Glikoz	Laktoz	Sükroz	Gaz	H ₂ S	İndol	Metil kırmızısı	Voges Proskauer	Sitrat
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	–	+	+	–	–
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+	–	–	–	+	+
<i>Acinetobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+

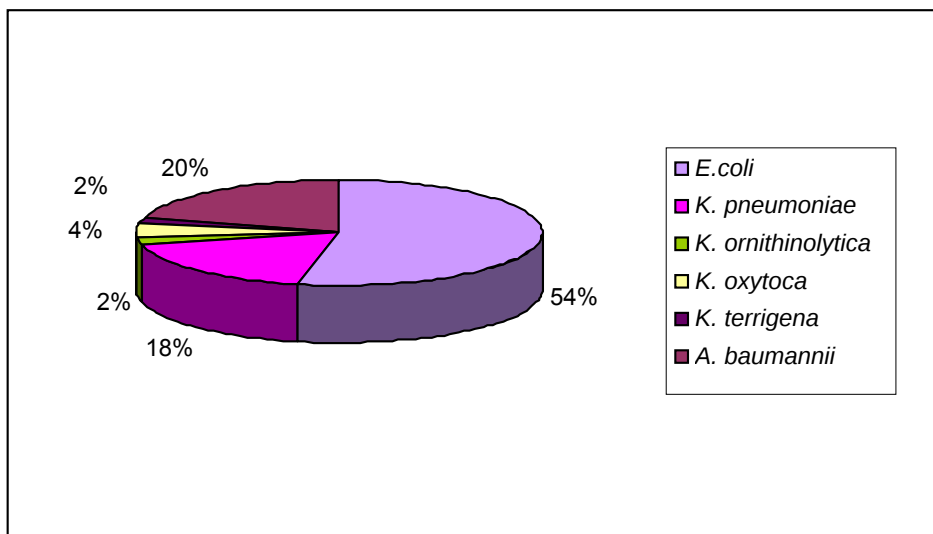
Çizelge 4.2. İzole edilen bakterilerin üreaz aktiviteleri ve hareket yetenekleri

Bakteriler	Üreaz aktivitesi	Hareket yeteneği
<i>E. coli</i>	–	+
<i>Klebsiella</i>	+	–
<i>Acinetobacter</i>	–	–



Resim 4.1. *A. baumannii* 88, *K. pneumoniae* 79 ve *K. oxytoca* 52 suşlarının API 20E test kiti ile verdikleri reaksiyonlar

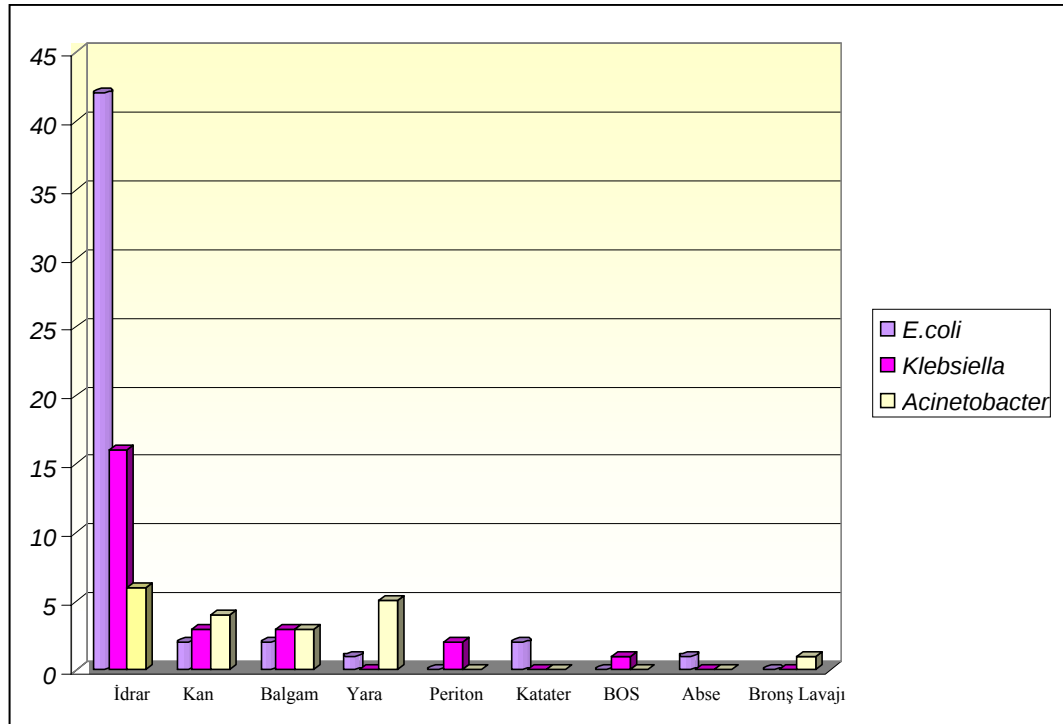
İncelenen bakterilerin %68'i idrar, %9,6'sı kan, %8,5'i balgam, %6,4'ü yara yeri, %2,1'i periton, %2,1'i katater, %1,1'i BOS, %1,1'i abse ve %1,1'i bronş lavajından izole edilmiştir. Bunların %17'si ayaktan, %83'ü yatarak tedavi edilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden alınmıştır. Bakterilerin türlere göre yüzde dağılım oranları Şekil 4.1'de verilmiştir. Bakterilerin klinik örneklerle ve türlere göre dağılımı Çizelge 4.3'te ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Bakterilerin türlere göre yüzde dağılım oranları

Çizelge 4.3. Bakterilerin klinik örneklerle ve türlere göre dağılımı

	İdrar	Kan	Balgam	Yara	Periton	Katater	BOS	Abse	Bronş Lavajı	Toplam (%)
<i>E.coli</i>	42	2	2	1	-	2	-	1	-	50 (54)
<i>K. pneumoniae</i>	9	2	3	-	2	-	1	-	-	17 (18)
<i>K. oxytoca</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (4)
<i>K. terrigena</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2 (2)
<i>K. ornithinolytica</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (2)
<i>A. baumannii</i>	6	4	3	5	-	-	-	-	1	19 (20)
Toplam (%)	64 (68)	9 (9,6)	8 (8,5)	6 (6,4)	2 (2,1)	2 (2,1)	1 (1,1)	1 (1,1)	1 (1,1)	94



Şekil 4.2. Bakterilerin klinik örneklerle göre dağılımı

Hastalardan elde edilen bakterilerin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzim üretimleri çift disk sinerji testi (ÇDST) ile incelenmiştir. ÇDST'ye göre 94 adet *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşunun 29 tanesinin (%31) GSBL (-) olduğu saptanırken, 65 tanesinin (%69) (+) olduğu saptanmıştır. GSBL (+) 65 suşun 42 tanesi (%64,6) *E. coli*, 15 tanesi (%23,1) *K. pneumoniae*, 1 tanesi (%1,5) *K. ornithinolytica*, 4 tanesi (%6,2) *K. oxytoca*, 2 tanesi (%3,1) *K. terrigena* ve 1 tanesi (%1,5) *A. baumannii* olarak; GSBL (-) 29 suşun ise 18 tanesi (%62) *A. baumannii*, 8 tanesi (%28) *E. coli*, 2 tanesi (%7) *K. pneumoniae* ve 1 tanesi (%3) *K. ornithinolytica* olarak tespit edilmiştir.

GSBL (+) 42 adet *E. coli* suşunun 34 tanesi (%81) idrar, 2 tanesi (%4,8) kan, 2 (%4,8) tanesi balgam, 1 tanesi (%2,4) yara, 2 tanesi (%4,8) katater ve 1 tanesi (%2,4) abseye ait kültürlerden; 15 *K. pneumoniae* suşunun 8 tanesi (%53,3) idrar, 2 tanesi (%13,3) kan, 2 tanesi (%13,3) balgam, 2 tanesi (13,3) periton ve 1 tanesi (%6,8) BOS'a ait kültürlerden; 4 adet *K. oxytoca* suşunun 4 tanesi (%100) idrar kültüründen; 2 adet *K. terrigena* suşunun 1 tanesi (%50) idrar ve 1 tanesi (%50) kan kültüründen, 1 adet (%100) *K. ornithinolytica* suşunun idrar kültüründen ve 1 adet (%100) *A. baumannii* suşunun balgam kültüründen izole edildiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.4'te GSBL (+) bakterileri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları gösterilmektedir.

GSBL (-) 8 adet *E. coli* suşundan 8 tanesinin (%100) idrar, 2 *K. pneumoniae* suşundan 1 tanesinin (%50) idrar ve 1 tanesinin (%50) balgam, 1 adet (%100) *K. ornithinolytica* suşundan idrar ve 18 adet *A. baumannii* suşundan 6 tanesinin (%33,3) idrar, 5 tanesinin (%27,8) yara yeri, 4 tanesinin (%22,2) kan, 2 tanesinin (%11,1) balgam ve 1 tanesinin (%5,6) bronş lavajı kültürlerinden izole edildiği saptanmıştır. Çizelge 4.5'te GSBL (-) bakterileri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları gösterilmektedir. Şekil 4.3'te ise klinik örneklerle göre GSBL (+) ve GSBL (-) suşların dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.4. GSBL (+) bakteri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları

*GSBL enzimi üreten bakterilerin toplam sayıları ve yüzde değerleri

#GSBL enzimi üreten bakterilerin klinik örneklerle göre toplam sayıları ve yüzde değerleri

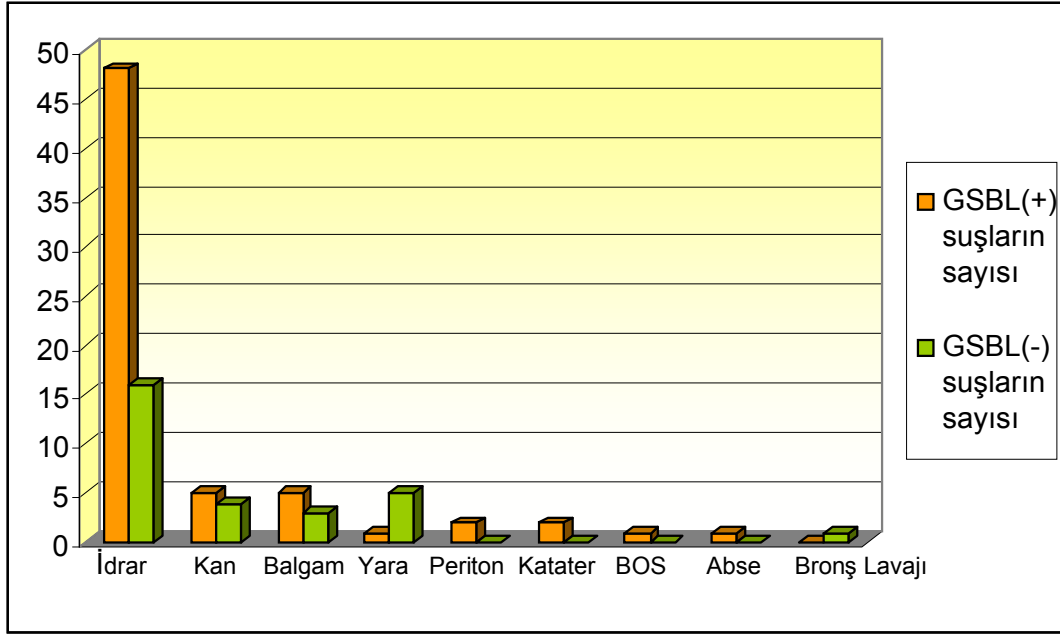
	İdrar	Kan	Balgam	Yara	Periton	Katater	BOS	Abse	GSBL (+) Toplam* (%)
<i>E. coli</i>	34	2	2	1	-	2	-	1	42 (64,6)
<i>K. pneumoniae</i>	8	2	2	-	2	-	1	-	15 (23,1)
<i>K. oxytoca</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	4 (6,2)
<i>K. terrigena</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	2 (3,1)
<i>K. ornithinolytica</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)
<i>A. baumannii</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (1,5)
GSBL (+) Toplam#(%)	48 (73,8)	5 (7,7)	5 (7,7)	1 (1,5)	2 (3,1)	2 (3,1)	1 (3,1)	1 (3,1)	65 (%100)

Çizelge 4.5. GSBL (-) bakteri türlerinin klinik örneklerle göre dağılımları

*GSBL (-) bakterilerin toplam sayıları ve yüzde değerleri

#GSBL (-) bakterilerin klinik örneklerle göre toplam sayıları ve yüzde değerleri

	İdrar	Kan	Balgam	Yara	Bronş lavajı	GSBL(-) Toplam (%)*
<i>E. coli</i>	8	-	-	-	-	8 (27,5)
<i>K. pneumoniae</i>	1	-	1	-	-	2 (6,9)
<i>K. ornitholytica</i>	1	-	-	-	-	1 (3,5)
<i>A. baumannii</i>	6	4	2	5	1	18 (62,1)
GSBL(-) Toplam(%)#	16(55,2)	4(13,7)	3(10,3)	5(17,3)	1(3,5)	29



Şekil 4.3. Klinik örneklerle göre GSBL (+) ve GSBL (-) suşların dağılımı

4.2. Çift Disk Sinerji Testi

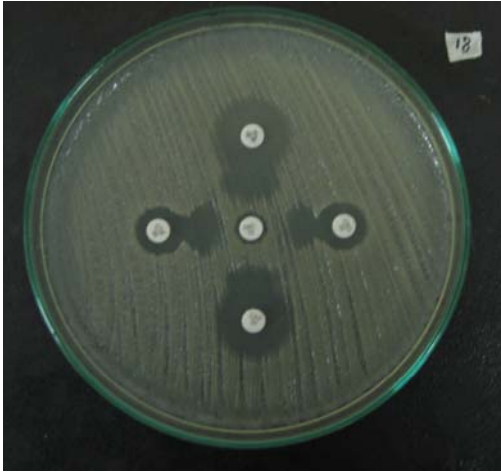
Çift disk sinerji testinde antibiyotikler arası uzaklık 30 mm olarak ayarlandığında 65 suşun 16'sı GSBL (+) olarak bulunmuştur. Kalan 49 suшта diskler arası uzaklık 25 mm'ye indirilip test tekrarlandığında 19 suшта daha GSBL saptanmıştır. Yine kalan 30 suшта diskler arası uzaklık 20 mm'ye indirildiğinde ise 29 suшта daha GSBL saptanmıştır. Sadece *A. baumannii* suşu için 23 mm'de testin pozitifliği tespit edilmiştir. Diskler arası uzaklık sadece *A. baumannii* suşlarında GSBL negatifliğini ayırt edebilmek için 15 mm'ye kadar indirilmiş, GSBL (+) suşlar için diskler arası uzaklığın 15 mm'ye indirilmesine gerek duyulmamıştır. Resim 4.2'de ÇDST'de GSBL (+) ve GSBL (-) bazı suşlar gösterilmektedir.



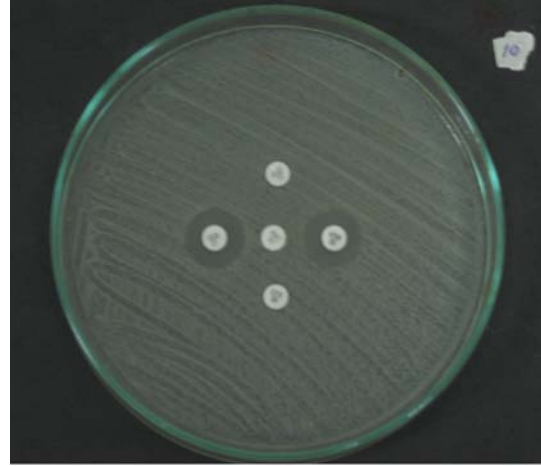
GSBL (+) *E. coli*



GSBL (-) *K. ornithinolytica*



GSBL (+) *K. pneumoniae*



GSBL (-) *A. baumannii*

Resim 4.2. ÇDST'de GSBL (+) ve GSBL (-) bazı suşlar

4.3. *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* Suşlarının Plazmit DNA Profil Analizleri

ÇDST sonrasında toplam 94 adet *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşunun plazmit DNA'ları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi izole edilmiş ve agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüş ve görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (Biometra BioDoc Analyze) UV ışık altında yapılmıştır.

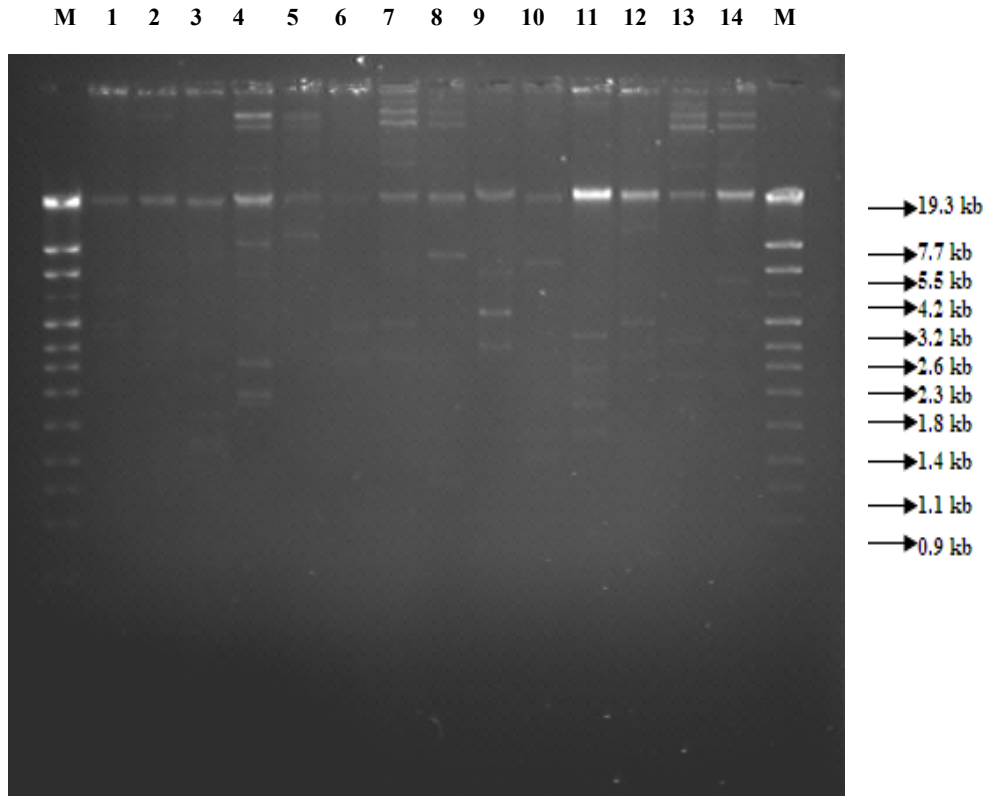
İncelenen izolatların 71 (%75,5) tanesinde plazmit DNA'sına rastlanmıştır, 23 (%24,5) tanesinde ise plazmit DNA tespit edilememiştir. 23 suştan 12 tanesi (%52,2) *A. baumannii*, 5 tanesi (%21,8) *E. coli*, 2 tanesi (%8,7) *K. pneumoniae*, 2 tanesi (%8,7) *K. oxytoca*, 1 tanesi (%4,3) *K. terrigena* ve 1 tanesinde *K. ornithinolytica* (%4,3) plazmit DNA elde edilememiştir. Geriye kalan 71 suşun plazmit DNA büyüklükleri λ -pUC mix-Markır 4 ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İzolatların taşıdığı plazmit sayısının 1–10 arasında değiştiği ve plazmit DNA büyüklüklerinin ise >19,3 kb ile 0,4 kb arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). GSBL (+) 65 izolatın 7 tanesinde (%10,7) plazmit DNA bulunmazken, 58 tanesinde (%89,3) plazmit DNA tespit edilmiştir. GSBL (-) toplam 29 izolatın ise 13'ünde (%44,8) plazmit DNA elde edilmiş, 16'sında (%55,2) plazmit DNA'ya rastlanmamıştır.

Çizelge 4.6. *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* türlerinin plazmit DNA sayıları ve plazmit büyüklükleri

Bakteri	Suş No	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklükleri (kb)
<i>E. coli</i>	1	-	-
	2	2	>19,3- 19,3
	3	8	4 adet plazmit > 19,3- 19,3- 7,7- 3,2- 2,4
	8	2	2 adet plazmit > 19,3
	9	4	>19,3- 19,3- 4,2- 1,4
	11	5	>19,3- 19,3- 4,2- 3,1- 1,1
	13	2	>19,3- 19,3
	14	6	3 adet plazmit > 19,3- 19,3- 6,4- 1,8
	16	4	>19,3- 19,3- 1,8- 0,9
	17	4	>19,3- 19,3- 2,6- 1
	25	3	>19,3- 19,3- 1,3
	26	-	-
	27	-	-
	28	-	-
	30	-	-
	38	1	19,3
	39	4	>19,3- 19,3- 11,6- 3
	40	2	>19,3- 19,3
	41	5	2 adet plazmit > 19,3- 19,3- 3,7- 0,9
	42	2	>19,3- 19,3
	51	7	19,3- 11,8- 2,8- 2- 1,2- 0,9- 0,6
	53	2	19,3- 0,7
	54	2	19,3- 9,5
	55	3	2 adet plazmit >19,3- 19,3
	56	3	>19,3- 19,3- 0,6
	57	3	2 adet plazmit > 19,3- 19,3
	58	6	19,3- 5,5- 3,5- 2,1- 1,2- 0,6
	59	6	2 adet plazmit >19,3- 19,3- 11,8- 9,5- 3- 2,8
	60	2	2 adet plazmit > 19,3- 19,3
	61	4	19,3- 14- 3,7- 1,8
	62	1	19,3
	63	5	>19,3- 19,3- 7,4- 2,8- 0,9
	64	1	19,3
	67	3	19,3- 3,6- 0,9
	68	1	19,3
	69	5	2 adet plazmit > 19,3- 19,3- 5,3- 2,4- 0,9
	70	2	>19,3- 19,3
	71	3	19,3- 9,5- 2,6
	72	2	19,3- 1,2
	73	3	2 adet plazmit > 19,3- 19,3
	74	2	19,3- 0,4
	75	8	19,3- 9,5- 4,9- 2,8- 2- 1,4- 1,2- 0,8
	76	4	>19,3- 19,3- 1,2- 0,8
	77	3	2 adet plazmit > 19,3- 19,3
	78	10	2 adet plazmit > 19,3- 19,3- 9,5- 4,9- 2,8- 2,2- 1,4- 0,8- 0,6
	80	4	19,3- 9,5- 1,2- 0,4
	81	5	19,3- 9,3- 6,2- 3,2- 2,6
	90	1	19,3
	91	1	19,3
	92	2	19,3- 3,4

Çizelge 4.6. (Devam) *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* türlerinin plazmit DNA sayıları ve plazmit büyüklükleri

Bakteri	Suş No	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklükleri (kb)
<i>K. pneumoniae</i>	4	1	19,3
	5	1	19,3
	15	7	3 adet plazmit >19,3- 19,3 -7,5 - 5,1- 2
	18	-	-
	19	4	2 adet plazmit > 19,3- 19,3- 9,6
	20	3	19,3- 3,1- 2
	21	7	4 adet plazmit > 19,3- 19,3- 3,1- 2
	22	6	4 adet plazmit > 19,3-19,3- 6,7
	23	4	19,3- 5,1- 3,6- 2,6
	24	2	19,3- 6,3
	32	5	19,3- 3,6- 1,8- 1,2- 1,1
	34	-	-
	36	4	19,3- 10,7- 3,1- 2,6
	37	7	4 adet plazmit > 19,3- 19,3- 2,8- 1,6
	47	6	4 adet plazmit > 19,3- 19,3- 4,8
	65	5	19,3- 9,6- 7,7-3- 2,8
<i>K. ornithinolytica</i>	79	1	19,3
	6	5	19,3- 3,3- 2,6- 1,2- 1
<i>K. oxytoca</i>	31	-	-
	7	-	-
	33	-	-
	52	2	19,3- 6,5
<i>K. terrigena</i>	86	3	19,3- 11,8- 2,8
	35	-	-
	66	2	19,3 – 3
<i>A. baumannii</i>	10	-	-
	12	-	-
	29	2	> 19,3- 19,3
	43	2	19,3- 7,7
	44	6	> 19,3- 19,3- 13- 6- 1,4- 1,1
	45	-	-
	46	-	-
	48	5	2 adet plazmit > 19,3- 19,3- 13- 6
	49	-	-
	50	-	-
	82	1	19,3
	83	-	-
	84	-	-
	85	-	-
	87	-	-
	88	-	-
	89	1	19,3
	93	1	19,3
	94	-	-

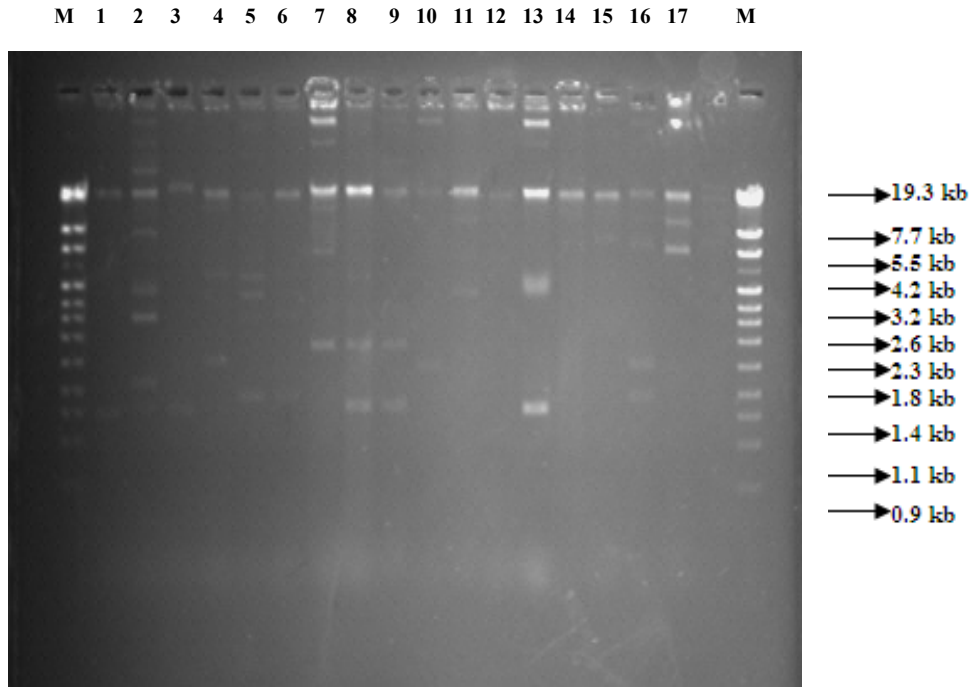


Resim 4.3. *Klebsiella* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *K. pneumoniae* 4 2. *K. pneumoniae* 5 3. *K. ornithinolytica* 6 4. *K. pneumoniae* 15 5. *K. pneumoniae* 19 6. *K. pneumoniae* 20 7. *K. pneumoniae* 21 8. *K. pneumoniae* 22 9. *K. pneumoniae* 23 10. *K. pneumoniae* 24 11. *K. pneumoniae* 32 12. *K. pneumoniae* 36 13. *K. pneumoniae* 37 14. *K. pneumoniae* 47

Klebsiella suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.3'te verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre Resim 4.3'te gösterilen 14 *Klebsiella* türünden *K. pneumoniae* 15, 21 ve 37 nolu izolatların sırasıyla 3 adet >19,3- 19,3- 7,5- 5,1- 2 kb; 4 adet >19,3- 19,3- 3,1- 2 kb ve 4 adet >19,3- 19,3- 2,8- 1,6 kb büyüklüğünde 7 adet, *K. pneumoniae* 22 ve 47 nolu izolatların sırasıyla 4 adet >19,3- 19,3- 6,7 kb ve 4 adet >19,3- 19,3- 4,8 kb büyüklüğünde 6 adet, *K. ornithinolytica* 6 ve *K. pneumoniae* 32 izolatlarının sırasıyla 19,3- 3,3- 2,6- 1,2- 1 kb ve 19,3- 3,6- 1,8- 1,2- 1,1 kb büyüklüğünde 5 adet, *K. pneumoniae* 19, 23 ve 36 nolu izolatların sırasıyla 2 adet >19,3- 19,3- 9,6 kb; 19,3- 5,1- 3,6- 2,6 kb ve 19,3- 10,7- 3,1- 2,6 kb büyüklüğünde 4 adet, *K. pneumoniae* 20 nolu izolatının 19,3- 3,1- 2 kb

büyükliğünde 3 adet, *K. pneumoniae* 24 nolu izolatının 19,3 ve 6,3 kb büyüklüğünde 2 adet, *K. pneumonia* 4 ve 5 nolu izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.

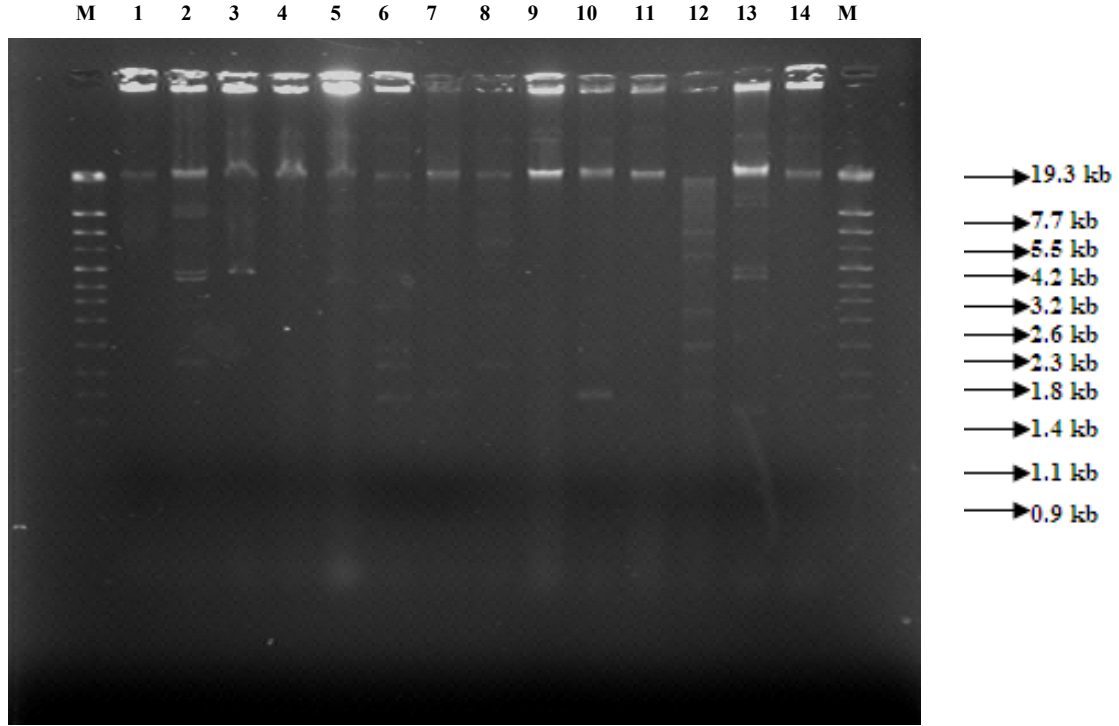


Resim 4.4. *E. coli* ve *Acinetobacter* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 2 2. *E. coli* 3 3. *E. coli* 8 4. *E. coli* 9 5. *E. coli* 11 6. *E. coli* 13 7. *E. coli* 14 8. *E. coli* 16 9. *E. coli* 17 10. *E. coli* 25 11. *E. coli* 39 12. *E. coli* 40 13. *E. coli* 41 14. *A. baumannii* 29 15. *A. baumannii* 43 16. *A. baumannii* 44 17. *A. baumannii* 48

Resim 4.4'te *E. coli* ve *Acinetobacter* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *E. coli* 14 ve *A. baumannii* 44 izolatlarının sırasıyla 3 tane >19,3- 19,3- 6,4- 1,8 kb ve >19,3- 19,3- 13- 6- 1,4- 1,1 kb büyüklüğünde 6 adet, *E. coli* 11, 41 ve *A. baumannii* 48 izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3- 4,2- 3,1- 1,1 kb; 2 tane >19,3- 19,3- 3,7- 0,9 kb ve 2 tane >19,3-19,3-13-6 kb büyüklüğünde 5 adet, *E. coli* 9, 16, 17 ve 39 izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3- 4,2- 1,4 kb; >19,3- 19,3- 1,8- 0,9 kb; >19,3- 19,3- 2,6- 1 kb ve >19,3- 19,3- 11,6- 3 kb büyüklüğünde 4 adet, *E. coli* 25 izolatının > 19,3- 19,3- 1,3 kb büyüklüğünde 3 adet, *A. baumannii* 29 ve 43 izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3 ve 19,3- 7,7 kb büyüklüğünde 2 adet, *E. coli* 2, 13 ve 40

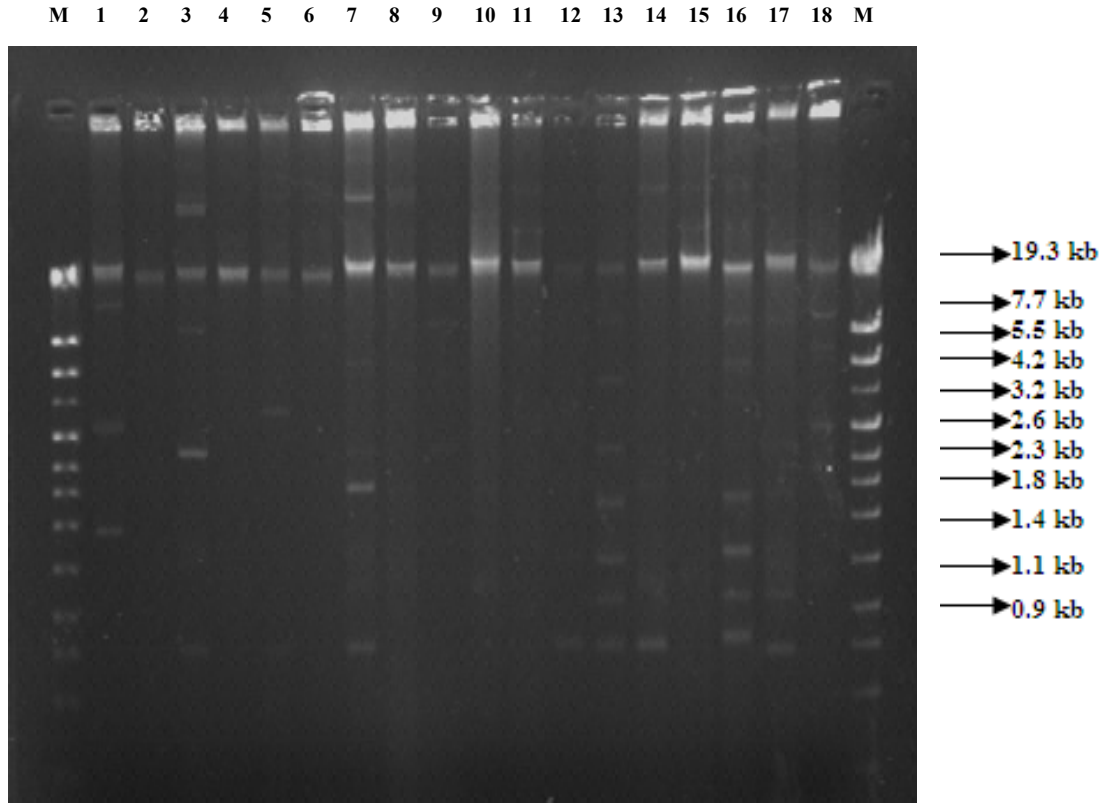
izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3 kb büyüklüğünde 2 adet, ve *E. coli* 8 izolatının 2 tane >19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.



Resim 4.5. *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri

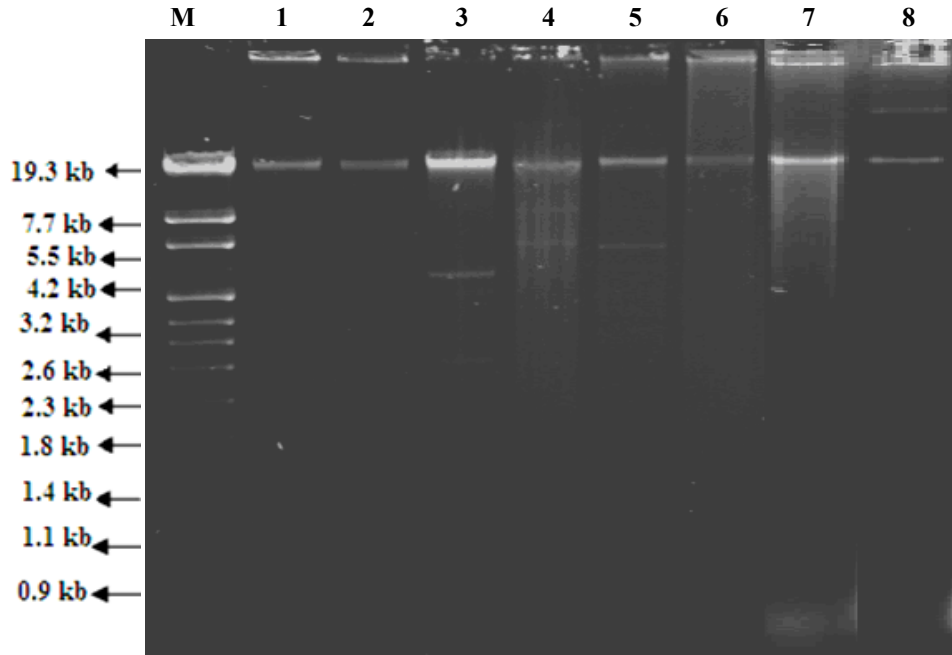
M. λ -pUC mix 1. *K. oxytoca* 52 2. *K. pneumoniae* 65 3. *K. terrigena* 66
4. *K. pneumoniae* 79 5. *K. oxytoca* 86 6. *E. coli* 51 7. *E. coli* 53 8. *E. coli* 54 9. *E. coli* 55 10. *E. coli* 56 11. *E. coli* 57 12. *E. coli* 58 13. *E. coli* 59 14. *E. coli* 60

Resim 4.5'te *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *E. coli* 51 izolatının 19,3- 11,8- 2,8- 2- 1,2- 0,9- 0,6 kb büyüklüğünde 7 adet, *E. coli* 58 ve 59 izolatlarının sırasıyla 19,3- 5,5- 3,5- 2,1- 1,2- 0,6 kb ve 2 tane >19,3- 19,3- 11,8- 9,5- 3- 2,8 kb büyüklüğünde 6 adet, *K. pneumoniae* 65 izolatının 19,3- 9,6- 7,7- 3- 2,8 kb büyüklüğünde 5 adet, *E. coli* 55, 56, 57 ve *K. oxytoca* 86 izolatlarının sırasıyla 2 tane >19,3- 19,3 kb; >19,3- 19,3- 0,6 kb; 2 tane >19,3- 19,3 kb; 19,3- 11,8- 2,8 kb büyüklüğünde 3 adet, *K. oxytoca* 52, *E. coli* 53, 54, 60 ve *K. terrigena* 66 izolatlarının sırasıyla 19,3- 6,5 kb; 19,3- 0,7 kb; 19,3- 9,5 kb; > 19,3- 19,3 kb ve 19,3- 3 kb büyüklüğünde 2 adet ve *K. pneumoniae* 79 izolatının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.



Resim 4.6. *E. coli* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri
 M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 61 2. *E. coli* 62 3. *E. coli* 63 4. *E. coli* 64 5. *E. coli* 67 6. *E. coli* 68 7. *E. coli* 69 8. *E. coli* 70 9. *E. coli* 71 10. *E. coli* 72 11. *E. coli* 73 12. *E. coli* 74 13. *E. coli* 75 14. *E. coli* 76 15. *E. coli* 77 16. *E. coli* 78 17. *E. coli* 80 18. *E. coli* 81

Resim 4.6'da *E. coli* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *E. coli* 78 izolatının 2 tane > 19,3- 19,3- 9,5- 4,9- 2,8- 2,2- 1,4- 0,8- 0,6 kb büyüklüğünde 10 adet; *E. coli* 75 izolatının 19,3- 9,5- 4,9- 2,8- 2- 1,4- 1,2- 0,8 kb büyüklüğünde 8 adet; *E. coli* 63, 69 ve 81 izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3- 7,4- 2,8- 0,9 kb; 2 tane > 19,3- 19,3- 5,3- 2,4- 0,9 kb ve 19,3- 9,3- 6,2- 3,2- 2,6 kb büyüklüğünde 5 adet, *E. coli* 61, 76, 80 izolatlarının sırasıyla 19,3- 14- 3,7- 1,8 kb; >19,3- 19,3-1,2- 0,8 kb ve 19,3- 9,5- 1,2- 0,4 kb büyüklüğünde 4 adet; *E. coli* 67, 71, 73 ve 77 izolatlarının sırasıyla 19,3- 3,6- 0,9 kb; 19,3- 9,5- 2,6 kb, 2 tane >19,3- 19,3 kb; 2 tane >19,3- 19,3 kb büyüklüğünde 3 adet; *E. coli* 70, 72 ve 74 izolatlarının sırasıyla >19,3- 19,3 kb; 19,3- 1,2 kb ve 19,3- 0,4 kb büyüklüğünde 2 adet; *E. coli* 62, 64 ve 68 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.



Resim 4.7. *E. coli* ve *Acinetobacter* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri

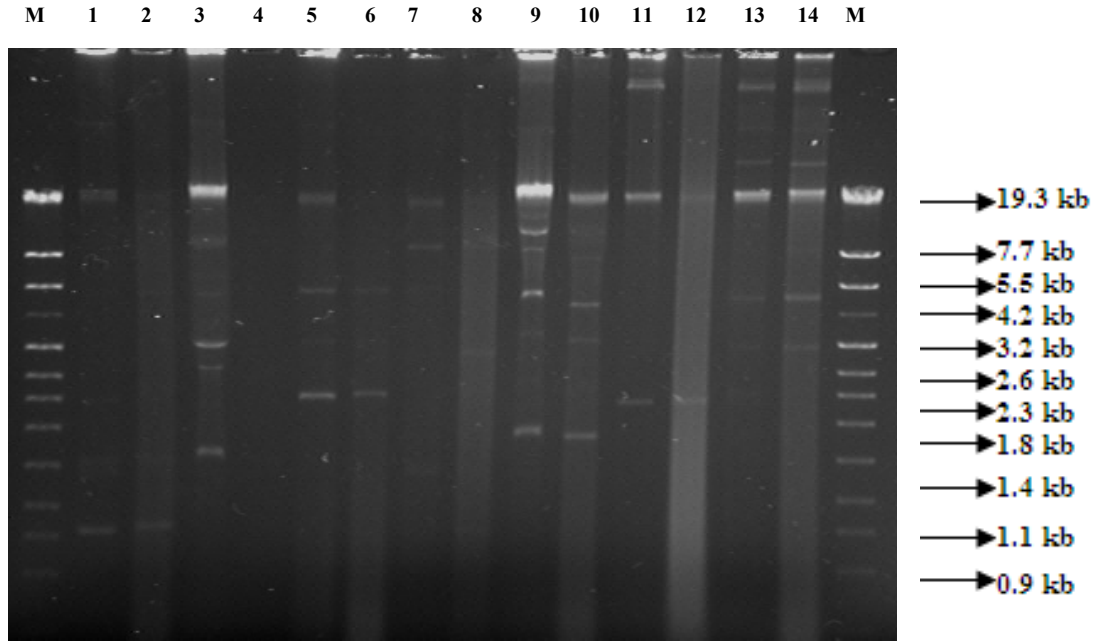
M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 90 2. *E. coli* 91 3. *E. coli* 92 4. *A. baumannii* 82 5. *A. baumannii* 89 6. *A. baumannii* 93 7. *E. coli* 38 8. *E. coli* 42

Resim 4.7'de *E. coli* ve *Acinetobacter* suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *E. coli* 92 izolatının 19,3 ve 3,4 kb büyüklüğünde 2 adet; *E. coli* 39, 90, 91 ve *A. baumannii* 82, 89, 93 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet, plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. 7 adet *E. coli* suşu, 2 adet *K. pneumoniae*, 1 adet *K. ornithinolytica*, 2 adet *K. oxytoca*, 1 adet *K. terrigena* ve 12 adet *A. baumannii* suşunda plazmit DNA bulunamamıştır.

4.4. GSBL Üretiminin Plazmit veya Kromozomal Kökeninin Araştırılması

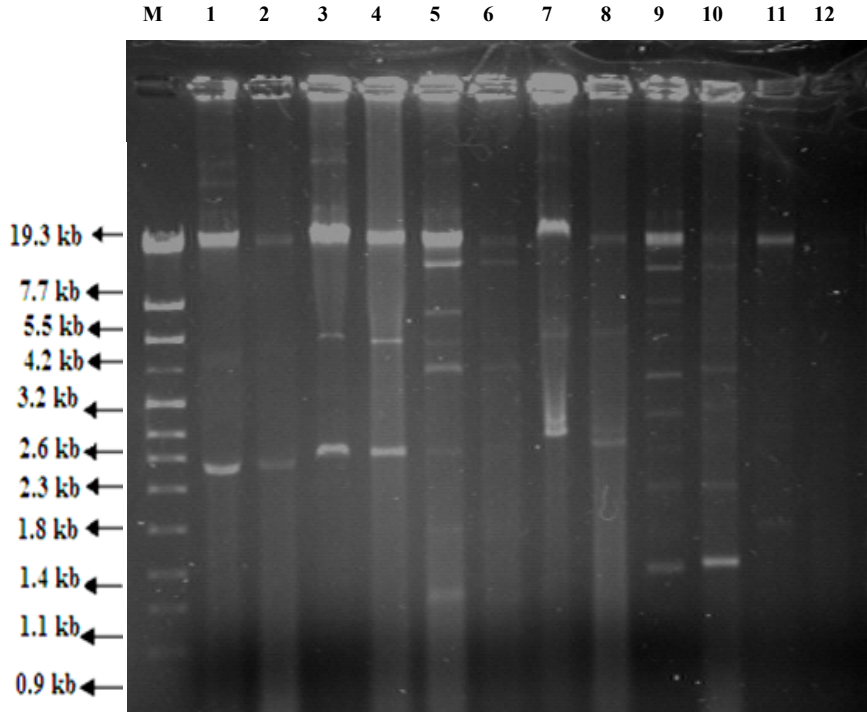
GSBL üretiminin plazmit veya kromozomal kökenli olup olmadığının incelenebilmesi için ÇDST sonucunda plazmit taşıyan GSBL (+) 58 izolat akridin oranj çözeltisiyle (mg/ml) muamele edildikten sonra (Bkz 3.2.7) plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır (Bkz 3.2.4). GSBL (+) suşların akridin oranj (AO) uygulanmayan (kontrol grubu) ve uygulanan (esas deney grubu) plazmit DNA'ları agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (Bkz 3.2.5). Plazmit DNA'ları incelenen 58 suşun (58 adet AO uygulanan ve 58 adet AO uygulanmayan suş) 11 (%19)

tanesinde AO uygulanan plazmit DNA bantlarında bir değişiklik görülmezken, 47 (%81) adet suşun plazmit DNA'sında akridin oranjin etkili olduğu görülmüştür. GSBL (+) suşların akridin oranjlı jel elektroforez görüntüleri Resim 4.8-Resim 4.15'te gösterilmektedir.



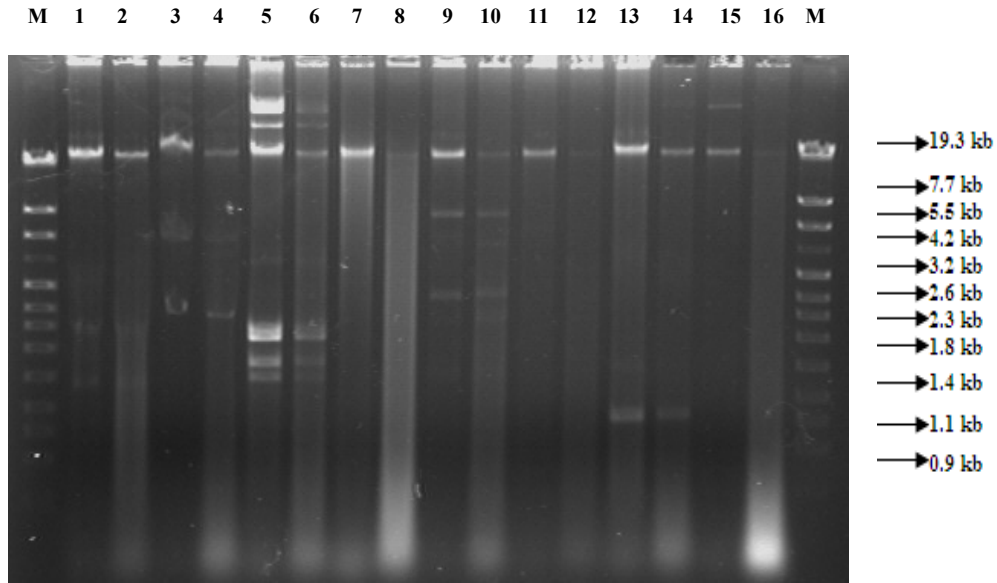
Resim 4.8.GSBL (+) *Klebsiella* ve *E. coli* suşların akridin oranjlı ve akridin oranjsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 8 2. *E. coli* 8+AO 3. *E. coli* 9 4. *E. coli* 9+AO
5. *E. coli* 13 6. *E. coli* 13+AO 7. *E. coli* 14 8. *E. coli* 14+AO 9. *K. pneumoniae* 15
10. *K. pneumoniae* 15+AO 11. *E. coli* 17 12. *E. coli* 17+AO 13. *K. pneumoniae* 19
14. *K. pneumoniae* 19+AO



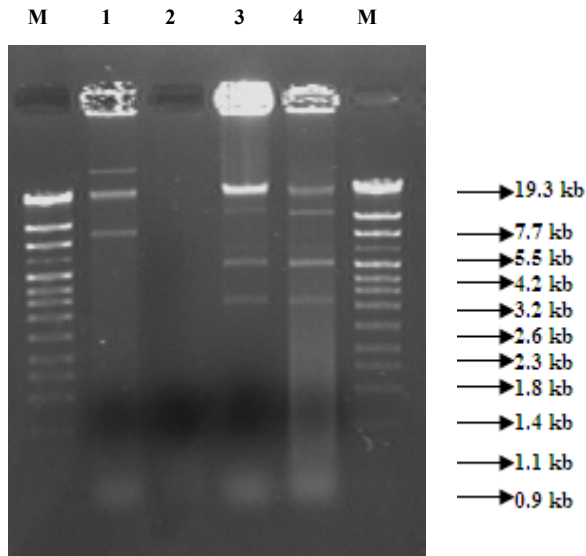
Resim 4.9. GSBL (+) *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin orajsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *K. pneumoniae* 20 2. *K. pneumoniae* 20+AO 3. *K. pneumoniae* 21 4. *K. pneumoniae* 21+AO 5. *K. pneumoniae* 22 6. *K. pneumoniae* 22+AO 7. *K. pneumoniae* 23 8. *K. pneumoniae* 23+AO 9. *K. pneumoniae* 24 10. *K. pneumoniae* 24+AO 11. *E. coli* 25 12. *E. coli* 25+AO



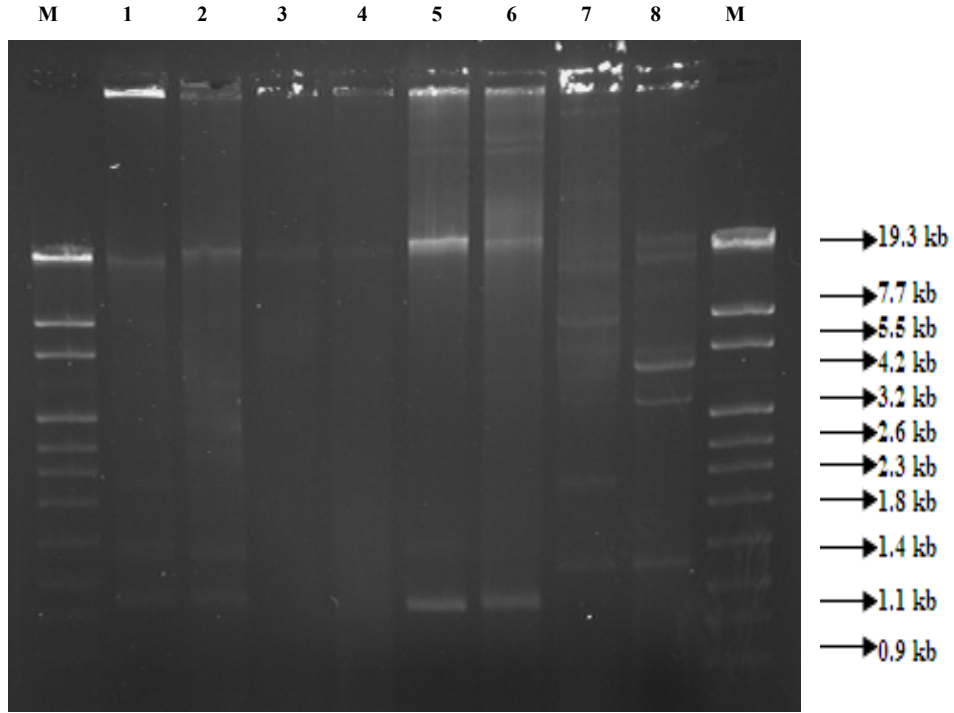
Resim 4.10. GSBL (+) *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin oranjsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *K. pneumoniae* 32 2. *K. pneumoniae* 32+AO 3. *K. pneumoniae* 36 4. *K. pneumoniae* 36+AO 5. *K. pneumoniae* 37 6. *K. pneumoniae* 37+AO 7. *E. coli* 38 8. *E. coli* 38 +AO 9. *E. coli* 39 10. *E. coli* 39+AO 11. *E. coli* 40 12. *E. coli* 40+AO 13. *E. coli* 41 14. *E. coli* 41+AO 15. *E. coli* 42 16. *E. coli* 42+AO

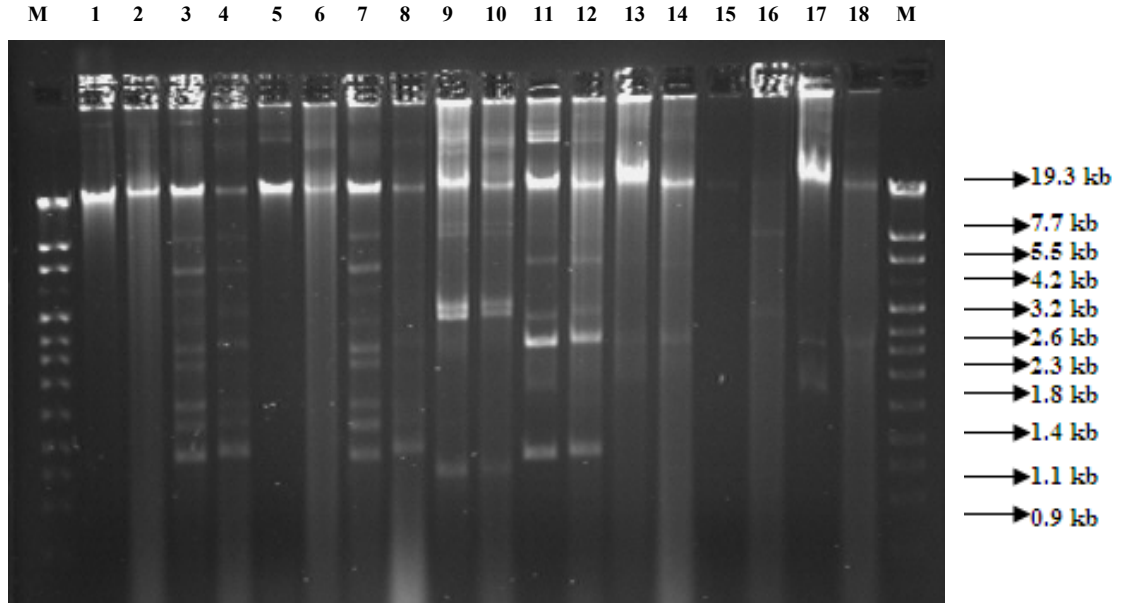


Resim 4.11. GSBL (+) *Acinetobacter* ve *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin oranjsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *A. baumannii* 43 2. *A. baumannii* 43+AO 3. *K. pneumoniae* 47 4. *K. pneumoniae* 47+AO

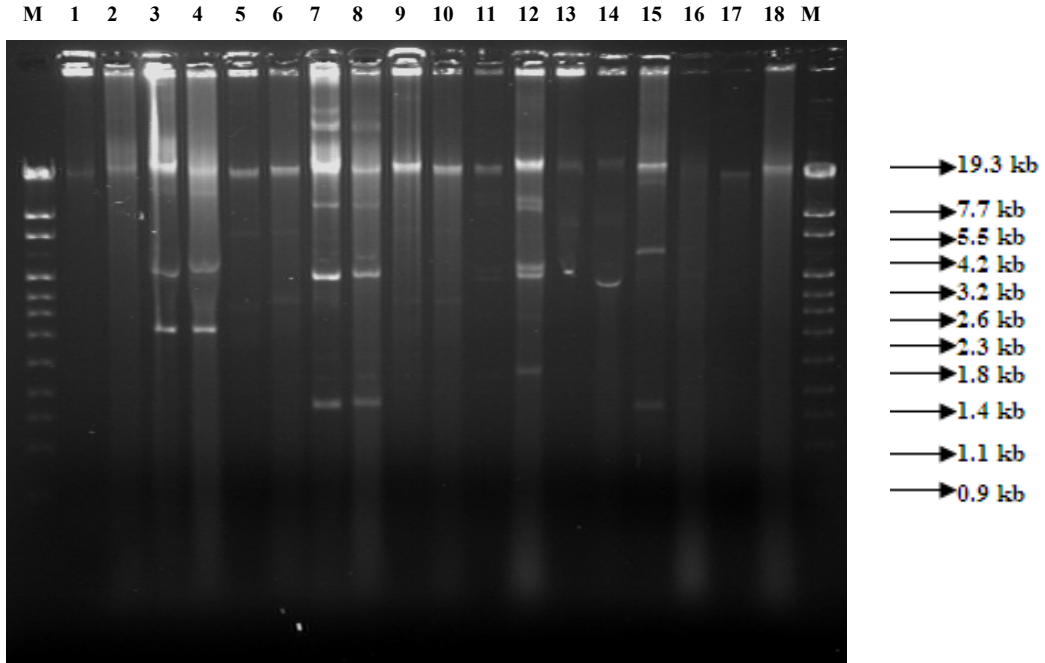


Resim 4.12. GSBL (+) *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarının akridin oranlı ve akridin oranlı agaroz jel elektroforez görüntüleri
M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 51 2. *E. coli* 51+AO 3. *K. oxytoca* 52 4. *K. oxytoca* 52+AO 5. *E. coli* 53 6. *E. coli* 53+AO 7. *E. coli* 54 8. *E. coli* 54+AO

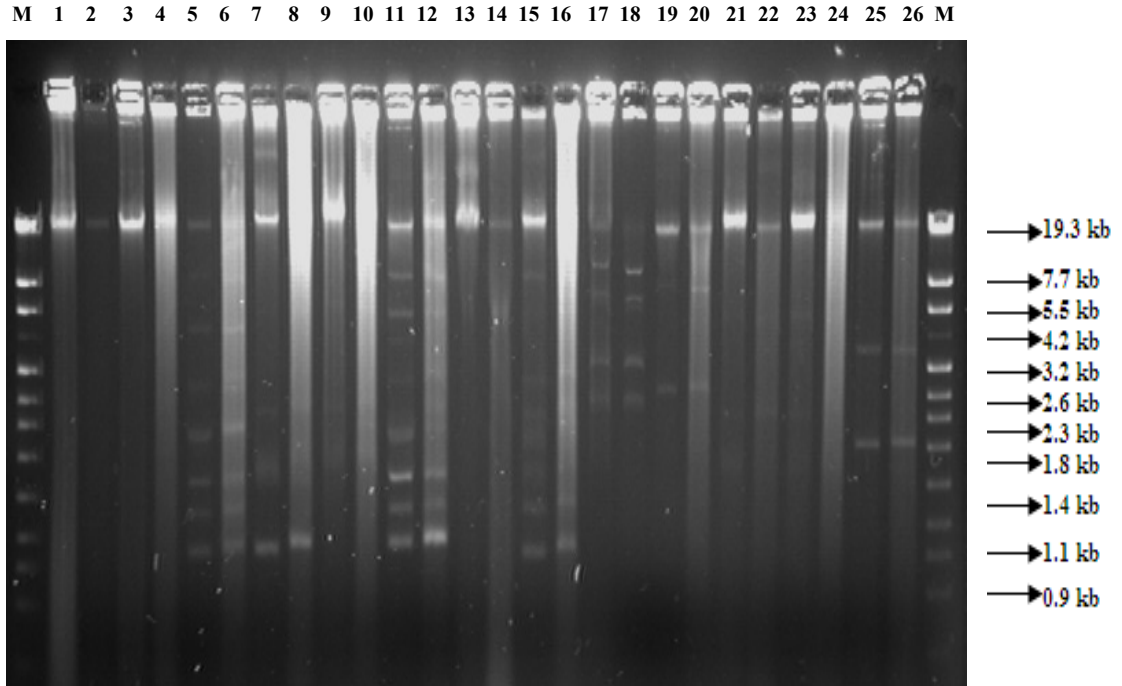


Resim 4.13. GSBL (+) *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin oranjsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 55 2. *E. coli* 55+AO 3. *E. coli* 56 4. *E. coli* 56+AO 5. *E. coli* 57 6. *E. coli* 57+AO 7. *E. coli* 58 8. *E. coli* 58+AO 9. *E. coli* 59 10. *E. coli* 59+AO 11. *E. coli* 69 12. *E. coli* 69+AO 13. *E. coli* 70 14. *E. coli* 70+AO 15. *E. coli* 71 16. *E. coli* 71+AO 17. *E. coli* 72 18. *E. coli* 72+AO



Resim 4.14. GSBL (+) *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin oranjsız agaroz jel elektroforez görüntüleri
M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 60 2. *E. coli* 60+AO 3. *E. coli* 61 4. *E. coli* 61+AO 5. *E. coli* 62 6. *E. coli* 62+AO 7. *E. coli* 63 8. *E. coli* 63+AO 9. *E. coli* 64 10. *E. coli* 64+AO 11. *K. pneumoniae* 65 12. *K. pneumoniae* 65+AO 13. *K. terrigena* 66 14. *K. terrigena* 66+AO 15. *E. coli* 67 16. *E. coli* 67+AO 17. *E. coli* 68 18. *E. coli* 68+AO



Resim 4.15. GSBL (+) *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarının akridin oranjlı ve akridin orajsız agaroz jel elektroforez görüntüleri

M. λ -pUC mix 1. *E. coli* 73 2. *E. coli* 73+AO 3. *E. coli* 74 4. *E. coli* 74+AO 5. *E. coli* 75 6. *E. coli* 75+AO 7. *E. coli* 76 8. *E. coli* 76+AO 9. *E. coli* 77 10. *E. coli* 77+AO 11. *E. coli* 78 12. *E. coli* 78+AO 13. *K. pneumoniae* 79 14. *K. pneumoniae* 79+AO 15. *E. coli* 80 16. *E. coli* 80+AO 17. *E. coli* 81 18. *E. coli* 81+AO 19. *K. oxytoca* 86 20. *K. oxytoca* 86+AO 21. *E. coli* 90 22. *E. coli* 90+AO 23. *E. coli* 91 24. *E. coli* 91+AO 25. *E. coli* 92 26. *E. coli* 92+AO

GSBL (+) suşlar akridin oranj (AO) ile muamele edildikten sonra tekrar ÇDST'ye (Bkz. 3.2.3) alınmıştır. ÇDST'de AO uygulanmayan ve uygulanan suşların zon çapları ve GSBL enzim üretimi kıyaslanmıştır. Buna göre; ÇDST'ye alınan toplam 58 suşun (58 adet AO uygulanmayan, 58 adet AO uygulanan) 4'ünde bakterilerin oluşturduğu zon çaplarının AO uygulanmayan suşlara göre bazı antibiyotikler için değişiklik gösterdiği, fakat suşların GSBL enzim üretimlerinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Çizelge 4.7'de *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşları için ÇDST'de kullanılan antibiyotiklerin direnç, duyarlılık ve orta duyarlılık zon çapları verilmiştir. Çizelge 4.8'de AO uygulanan ve uygulanmayan suşların antibiyotik zon çapları verilmiştir. Resim 4.15 ve 4.16'da ise ÇDST'de AO uygulaması ile zon çapları değişen suşlar verilmiştir.

Çizelge 4.7. *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşları için ÇDST’de kullanılan antibiyotiklerin direnç, duyarlılık ve orta duyarlılık zon çapları

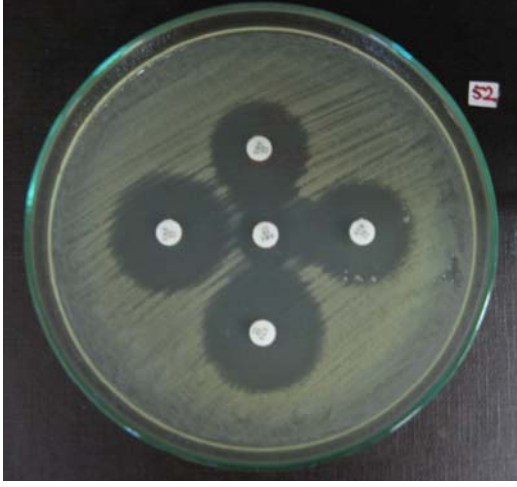
Antibiyotikler	Antibiyotik Zon Çapları (mm)		
	Dirençli (R)	Orta duyarlı (I)	Duyarlı (S)
Seftriakson (30µg)	≤ 13	14- 20	≥ 21
Seftazidim (30 µg)	≤ 14	15- 17	≥ 18
Sefotaksim (30µg)	≤ 14	15- 22	≥ 23
Aztreonam (30 µg)	≤ 15	16- 21	≥ 22
Amoksisilin/Klavulonik asit (20/10 µg)	≤ 13	14 -17	≥ 18

Çizelge 4.8. Akridin oranj uygulanan ve uygulanmayan suşların antibiyotik zon çapları

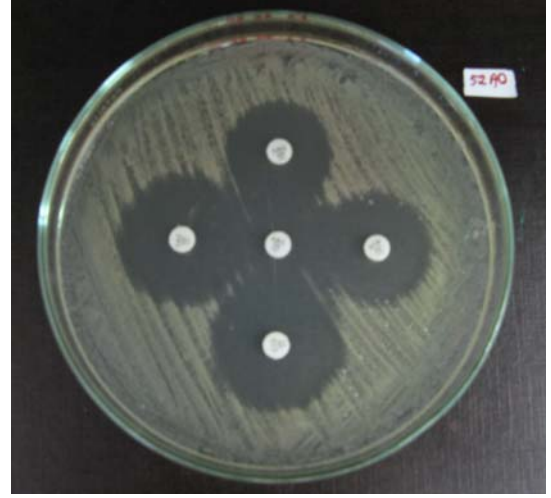
AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, CRO: Seftriakson, CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim, ATM: Aztreonam

	Antibiyotik Zon Çapları (mm)				
	CRO*	CAZ*	AMC*	CTX*	ATM*
<i>K. oxytoca</i> 52	25	30	15	30	27
<i>K. oxytoca</i> 52+AO	25	35	15	35	30
<i>E. coli</i> 53	20	25	-	20	24
<i>E. coli</i> 53 +AO	20	25	-	20	26
<i>E. coli</i> 56	-	13	15	-	9
<i>E. coli</i> 56+AO	10	18	15	10	15
<i>E. coli</i> 67	-	15	-	-	10
<i>E. coli</i> 67+AO	10	20	-	12	20

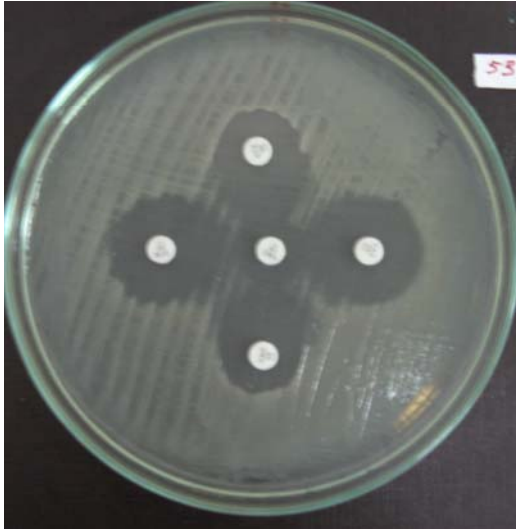
ÇDST sonuçlarına göre AO uygulanan suşların %6,9’unun AMC, CRO, CAZ, CTX ve ATM antibiyotikleri için zon çaplarında 2-10 mm arasında değişen genişlemeler görülmüştür.



K. oxytoca 52



K. oxytoca 52+AO

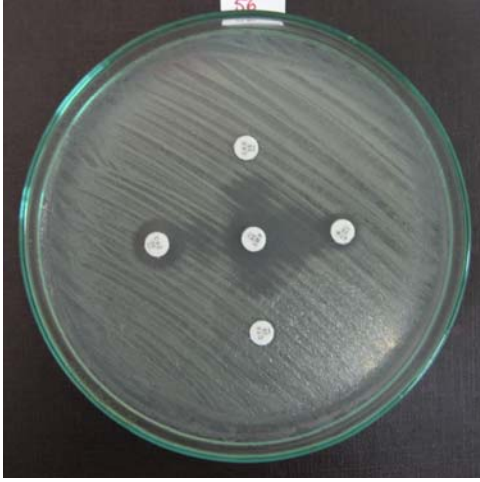


E. coli 5

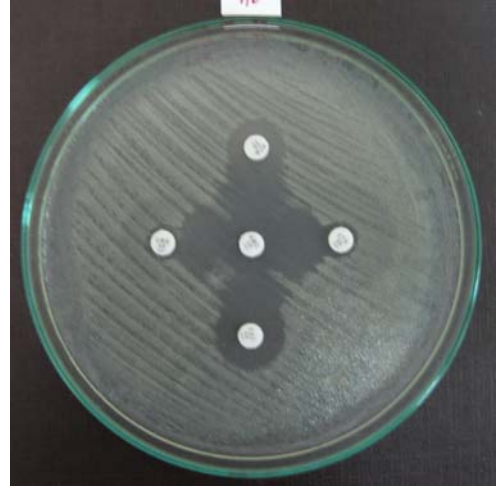


E. coli 53+AO

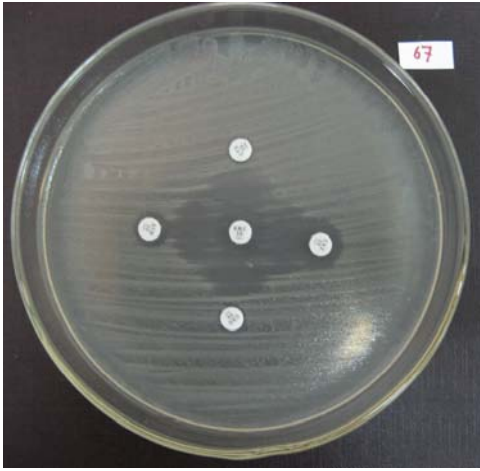
Resim 4.16. AO uygulaması ile ÇDST’de zon çapları değişen *E. coli* ve *K. oxytoca* suşları



E. coli 56



E. coli 56+AO



E. coli 67



E. coli 67+AO

Resim 4.16. (Devam) AO uygulaması ile ÇDST'de zon çapları değişen *E. coli* ve *K. oxytoca* suşları

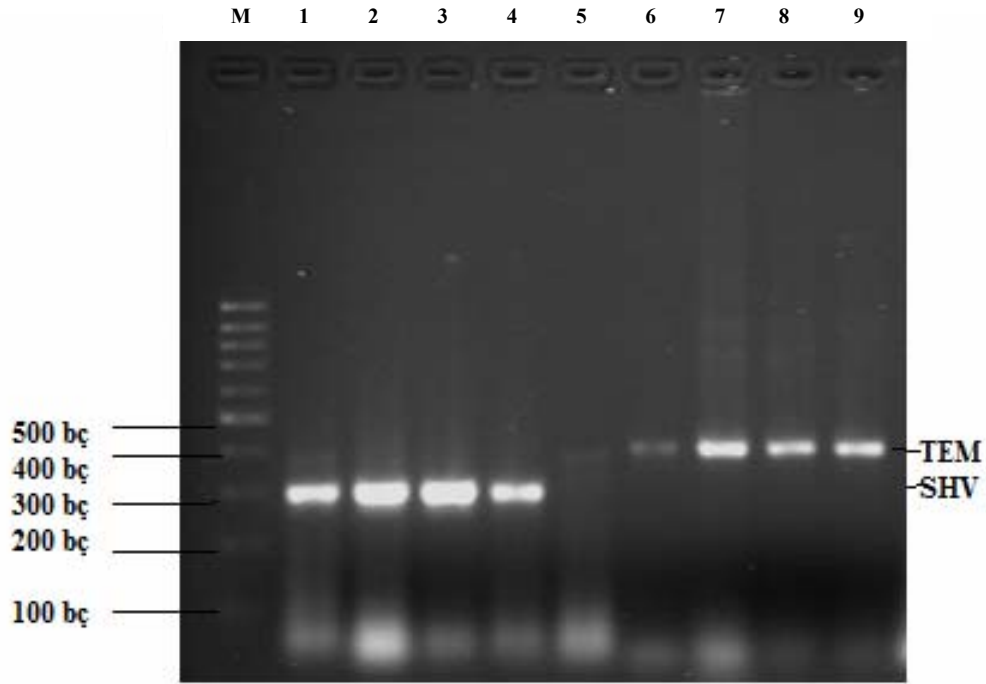
4.5. PZR ile GSBL Enzimlerinin Tiplendirilmesi ve DNA Dizi Analizi Sonuçları

İzole edilen ve tanımlanmaları yapılan 94 adet *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşunun GSBL geni taşıyıp taşımadıkları PZR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. GSBL enzimlerinin tiplendirilmesi için TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri tasarlanmıştır. Primer tasarımı için önce hedef genotipler belirlenmiş ve daha sonra makalelerden alınan Genbank erişim numaralarına (SHV, EF125011; TEM, AB282997; CTX-M, DQ303459; OXA, L07945) ve hedef genotipleri içeren gen bankası kayıtlarına ulaşılmıştır. Bulunan dizilere önce *CLC Free Workbench* programı kullanılarak çoklu hizalama (multiple alignment) yapılmıştır. *Artemis* programında dizinin kodlanan gen bölgeleri seçilerek *Perl Primer* programına aktarılmış ve her bir GSBL tipi için farklı büyüklükte PZR ürünü oluşacak şekilde 20-22 baz uzunluğunda primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı sonrasında PZR optimizasyonu sağlanmıştır (Bkz 3.2.10). Bunun sonucunda elde edilen PZR ürünleri Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde %2'lik agaroz jeller hazırlanarak yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapılmıştır. PZR ürünlerinin büyüklükleri SM0241 markır ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

94 adet suşta TEM primeri ile yapılan PZR sonucunda toplam 32 adet (%34,05) *E. coli*, 11 adet (%11,8) *K. pneumoniae*, 2 adet (%2,12) *K. terrigena*, 1 adet (%1,06) *K. ornithinolytica* ve 1 adet (%1,06) *K. oxytoca* suşları olmak üzere toplam 47 adet (%50) suşun yaklaşık olarak 400 bp (baz çifti) büyüklüğünde PZR ürünü verdiği gözlenmiştir. Bu suşlardan ikisinin ÇDST sonucu GSBL (-) olarak tespit edilmesine rağmen PZR'de TEM primeri ile 2 adet (%2,13) *E. coli* suşunun pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir (Resim 4.7).

94 adet suşta SHV primeri ile yapılan PZR sonucunda 8 adet (%8,5) *K. pneumoniae*, 4 adet (%4,25) *E. coli*, 1 adet (%1,06) *K. ornithinolytica* ve 1 adet (%1,06) *K. oxytoca* suşları olmak üzere toplam 14 adet (%14,87) suşun yaklaşık olarak 300 bp büyüklüğünde PZR ürünü verdiği gözlemlenmiştir. SHV primeri ile pozitif reaksiyon veren suşların ÇDST için de pozitif oldukları belirlenmiştir. Hem TEM hem SHV

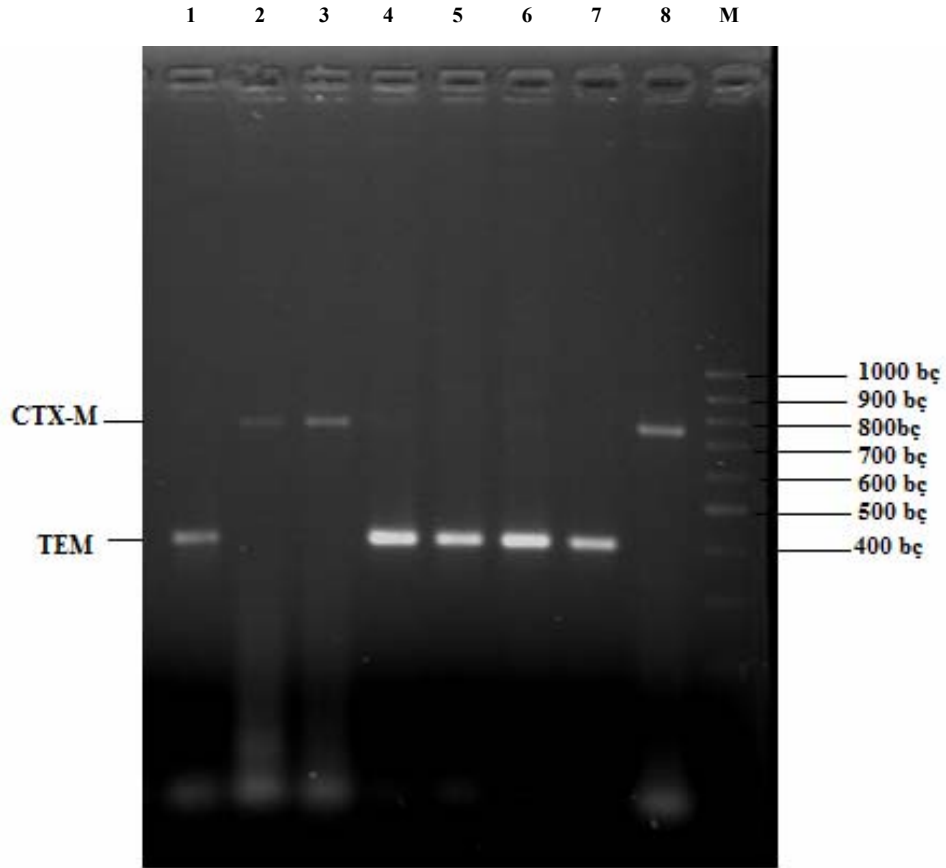
primerleriyle pozitif reaksiyon veren 6 adet (%6,4) *K. pneumoniae*, 2 adet (%2,12) *E. coli* ve 1 adet (%1,06) *K. ornithinolytica* olmak üzere toplam 9 adet (%9,6) suş bulunmuştur (Resim 4.16).



Resim 4.17. TEM ve SHV primerleriyle pozitif reaksiyon veren bazı suşların jel elektroforez görüntüleri

M. SM0241 1. *K. oxytoca* 7 2. *E. coli* 17 3. *K. pneumoniae* 19 4. *K. pneumoniae* 32 5. *E. coli* 53 6. *E. coli* 54 7. *E. coli* 55 8. *E. coli* 56 9. *E. coli* 57

CTX-M primeri ile yapılan PZR sonucunda 10 adet (%10,6) *E. coli* ve 1 adet (%1,06) *K. pneumoniae* suşu olmak üzere toplam 11 suшта (%11,7) 700-800 bp büyüklüğünde PZR ürünü belirlenmiştir. CTX-M primeriyle pozitif reaksiyon veren 8 adet (%8,5) *E. coli* ve 1 adet (%1,06) *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 9 adet (%9,6) izolatin TEM primeriyle de pozitif reaksiyon verdiği saptanmıştır. CTX-M primeri ile pozitif reaksiyon veren suşların ÇDST sonucuna göre de pozitif oldukları belirlenmiştir. Resim 4.17’de TEM ve CTX-M primerleriyle pozitif reaksiyon veren bazı suşların jel elektroforez fotoğrafı gösterilmektedir.



Resim 4.18. TEM ve CTX-M primeri ile pozitif reaksiyon veren *E. coli* suşlarının jel elektroforez görüntüleri

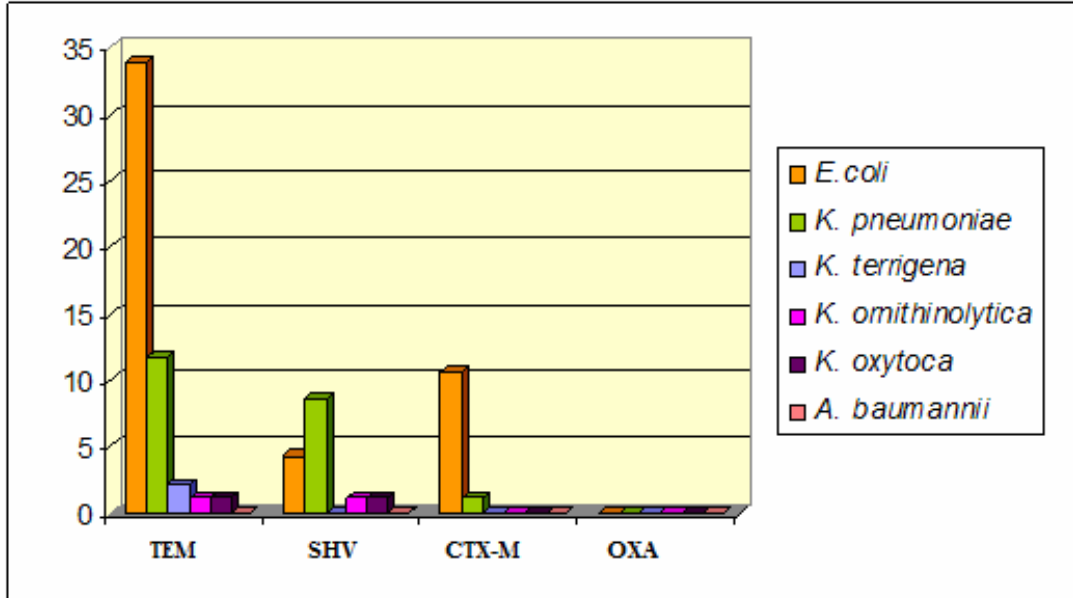
1. *E. coli* 38 2. *E. coli* 53 3. *E. coli* 54 4. *E. coli* 61 5. *E. coli* 62 6. *E. coli* 63 7. *E. coli* 64 8. *E. coli* 70 M. SM0241

OXA primeri ile yapılan PZR sonucunda ise belirgin bir PZR ürünü saptanmamıştır. Çizelge 4.9’da TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleriyle pozitif reaksiyon veren izolatların dağılımı verilmiştir. Şekil 4.4’te TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri ile çalışan bakteri suşlarının yüzde oranları gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleriyle pozitif reaksiyon veren izolatların dağılımı

*PZR ile tespit edilen toplam 67 GSBL (+) suş olmasına rağmen bazı suşlarda iki tip GSBL birlikte saptandığından toplam suş sayısı fazladır.

	TEM tipi GSBL	SHV tipi GSBL	CTX-M tipi GSBL	OXA tipi GSBL	Toplam* (%)
<i>E. coli</i>	32 (34,05)	4 (4,25)	10 (10,6)	-	46 (48,9)
<i>K. pneumoniae</i>	11 (11,8)	8 (8,5)	1 (1,06)	-	20 (21,3)
<i>K. terrigena</i>	2 (2,12)	-	-	-	2 (2,12)
<i>K. ornithinolytica</i>	1 (1,06)	1 (1,06)	-	-	2 (2,12)
<i>K. oxytoca</i>	1 (1,06)	1 (1,06)	-	-	2 (2,12)
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-
Toplam (%)	47 (50)	14 (14,8)	11 (11,7)	-	72 (76,5)

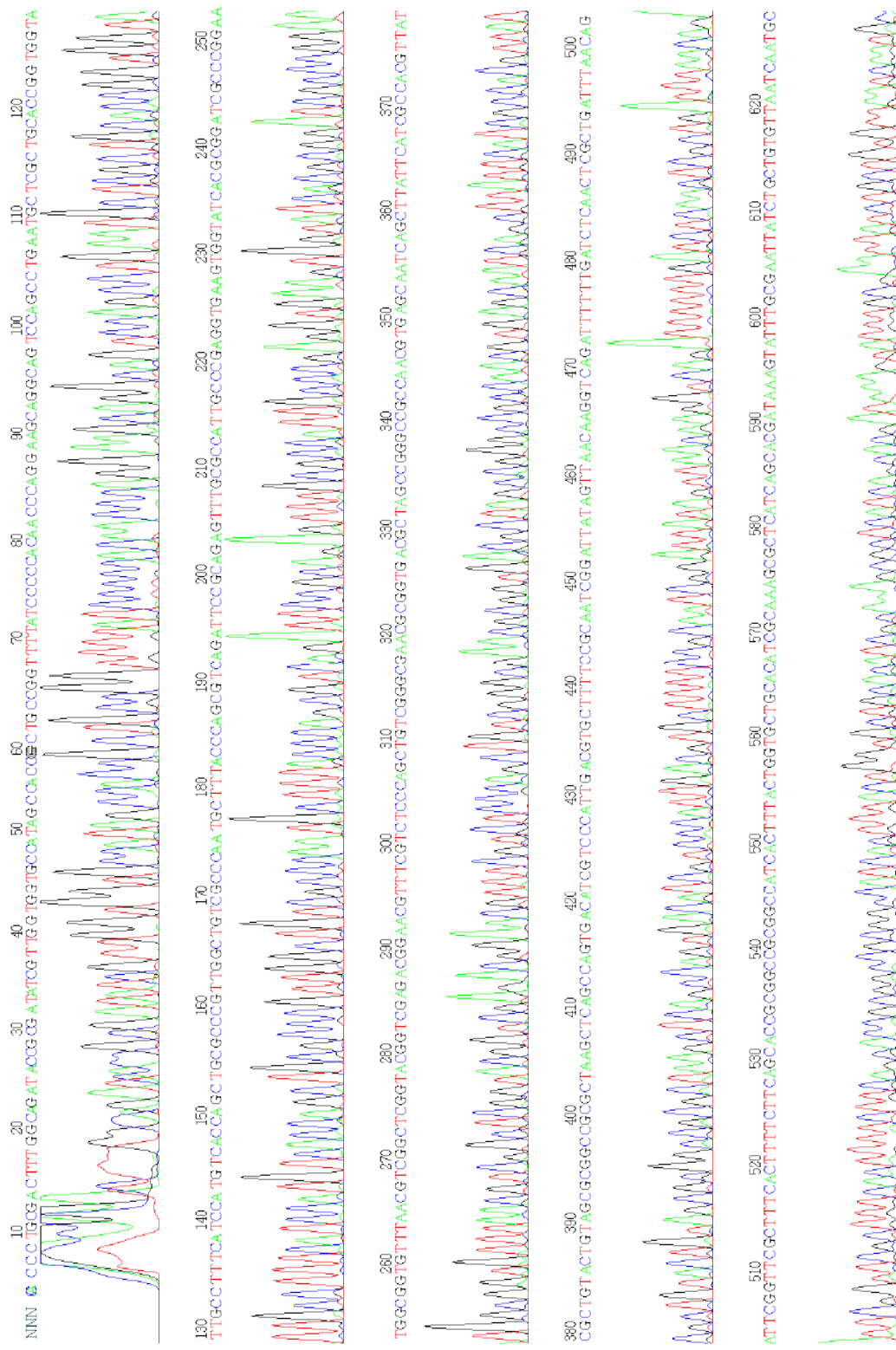


Şekil 4.4. TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri ile çalışan bakteri suşlarının yüzde oranları

TEM, SHV ve CTX-M PZR ürünlerinden bazıları seçilerek ticari bir firmaya gönderilmiş ve DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Firmanın gönderdiği sonuçlar kromotogram dosyaları şeklinde *Finch TV* programı ile açılarak diziler çıkartılmıştır (Şekil 4.5-Şekil 4.7). Gelen dizilerin DNA gen veritabanında BLAST yazılımı ile karşılaştırılmaları yapılmıştır (Çizelge 4.10- Çizelge 4.12).







Şekil 4.7. *E. coli* 90 izolatının CTX-M-R primeri için kromatogram sonucu

Karşılaştırmalar sonucunda, TEM primeri ile yapılan BLAST araştırmasında gen bankasında mevcut diziler ile *E. coli* 54 izolatının TEM tipi GSBL (+) *E. coli* (DQ256080) izolatıyla %99 uyumluluk gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *E. coli* 54 izolatının TEM-144 tipi GSBL (+) *E. coli* (DQ256080) suşu ile dizi eşleştirme sonucu

İzolat:12	TTTTTGCTC-CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC 70
Ref: 276	TTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC 335
İzolat:71	GAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCG 130
Ref :336	GAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTCGCCCCG 395
İzolat:131	AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGNCGGTATTATCCC 190
Ref: 396	AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGGTATTATCCC 455
İzolat: 191	GTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG 250
Ref: 456	GTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG 515
İzolat:251	TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT 310
Ref: 516	TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT 575
İzolat: 311	GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGNACAACGAT 369
Ref: 576	GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTG-ACAACGAT 633

Ref: Referans

SHV primeri ile yapılan BLAST araştırması sonucu, gen bankasındaki mevcut diziler ile *K. pneumoniae* 19 izolatu karşılaştırıldığı zaman SHV tipi GSBL (+) *K. pneumoniae* 763 (DQ219476) izolatının *K. pneumoniae* 19 izolatıyla %99 uyumluluk gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *K. pneumoniae* 19 izolatının SHV tipi GSBL (+) *K. pneumoniae* 763 izolatı (DQ219476) ile dizi eşleştirme sonucu

İzolat:51	AAGCGAATGCCAGCTGTCNGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCG	110
Ref:93	AAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCG	152
İzolat:111	CACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGT	170
Ref:153	CACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGT	212
İzolat:171	GCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGAT	230
Ref: 213	GCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGAT	272
İzolat:231	CCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTIONCTCG	264
Ref: 273	CCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTIONCTCG	306

CTX-M primeri ile yapılan BLAST araştırması sonucu, gen bankasındaki mevcut diziler ile *K. pneumoniae* 79 izolatu karşılaştırıldığı zaman CTX-M-15 tipi GSBL (+) *K. pneumoniae* (DQ302097) izolatıyla %99 uyumluluk gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *K. pneumoniae* 79 izolatının CTX-M-15 tipi GSBL (+) *K. pneumoniae* (DQ302097) izolat ile dizi eşleştirme sonucu

İzolat:13	TTA G AAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGAATTA 71
Ref:101	TTA G AAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGAATTA 160
İzolat:72	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA 131
Ref: 161	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA 220
İzolat:132	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG 191
Ref: 221	ATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCG 280
İzolat:192	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATC 251
Ref: 281	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATC 340
İzolat:252	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATG 311
Ref:341	AAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATG 400
İzolat:312	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG 371
Ref: 401	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG 460
İzolat:372	CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCACAGCTGGGAGAC 431
Ref:461	CTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCACAGCTGGGAGAC 520
İzolat:432	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG 491
Ref: 521	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG 580

Çizelge 4.12. (Devam) *K. pneumoniae* 79 izolatının CTX-M-15 tipi GSBL (+) *K. pneumoniae* (DQ302097) izolatı ile dizi eşleştirme sonucu

İzolat:492	CGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	551
Ref: 581	CGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAA	640
İzolat:552	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	611
Ref: 641	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGT	700
İzolat:612	GCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTGTGGGGGATAAAACCGGCAGC	671
Ref: 701	GCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTGTGGGGGATAAAACCGGCAGC	760
İzolat: 672	GGTGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGT-ATCTG-CCAAA	713
Ref: 761	GGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGCCAAA	804

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Beta-laktam antibiyotiklerini hidroliz eden ve aktifliğini gideren beta-laktamaz üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir [4].

Gram negatif patojenler arasında geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç büyük ölçüde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ile ilişkilidir. Bu enzimler üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç gibi ciddi klinik problemlere neden olurlar [82]. *Enterobacteraceae*'de GSBL'ler esas olarak *Klebsiella spp.* ve *E. coli* suşlarında bulunmakla birlikte diğer cinslerde de rapor edilmektedir. GSBL'ler, coğrafik bölgelere bağlı olarak yayılışı ve enterobakteriyel türlerin dağılımı ile dünya çapında yaygındır [83].

GSBL'ler 1980'lerin başlarında ilk Almanya'da ve kısa bir zaman sonra Fransa'da önem kazanmaya başlamıştır. *E. coli* ve *K. pneumoniae* arasında geniş yayılım gösteren TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri olan bu ilk GSBL'ler genel penisilinazların yapısal mutasyonlarıdır. 1990'larda GSBL'ler ile ilgili birçok rapor Fransa'dan gelmekle beraber Şili, Tunus, İngiltere ve Amerika'da da GSBL rapor edilmiştir. Sonradan 1990'lar boyunca TEM ve SHV kökenli GSBL'ler ile ilgili giderek artan sayıda rapor vardır [84]. GSBL enzimleri *Enterobacteraceae* ailesinin birçok üyesinde görülmekle birlikte en sık *K. pneumoniae* suşlarından izole edilmiştir [30].

Avrupa'da GSBL üretim sıklığı açısından ülkeler arasında farklılık gözlemlenmektedir. 1995-2003 yılları arasında Güney İspanya'da *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL üretim sıklığı karşılaştırılmış ve *E. coli* izolatlarının %1,7 ve *K. pneumoniae* izolatlarının %3,98 oranında GSBL ürettiği saptanmıştır. *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin düzenli bir artış göstererek 1995'de %0,31 iken 2003'de %4,8 çıktığı, *K. pneumoniae* izolatlarının ise 1995-1997 yılları arasında %7,2 iken 1998-2003 yılları arasında %2,5'e düştüğü belirlenmiştir [85].

2002 yılında Kore’de yapılan bir çalışmada, toplam 9219 *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşu Kore’nin altı farklı bölgesinde 13 hastaneden toplanmış ve suşların GSBL üretimi ÇDST ile belirlenmiştir. Suşların %39,2’sinin GSBL ürettiği ve bunların %30’ unun *K. pneumoniae* ve %9,2’sinin ise *E. coli* olduğu tespit edilmiştir [86].

SMART antimikrobiyal araştırma programı kapsamında 2002-2003 yılları arasında yapılan bir çalışmada, GSBL pozitif izolatlardaki dağılım Amerika, Avrupa, Latin Amerika, Orta Doğu ve Asya Pasifik bölgesinde sırasıyla; *E. coli* suşunda %3, %5, %10, %13 ve %17, *Klebsiella spp.* suşunda %7, %11, %14, %20 ve %18, ve *Enterobacter spp.* suşunda %16, %7, %20, %12 ve %21 olarak bulunmuştur [87] .

Hindistan’da 2003- 2004 yılları arasında 150 *Acinetobacter* suşunda ÇDST ile GSBL üretimi araştırılmıştır ve *Acinetobacter* suşlarında %28 oranında GSBL tespit edilmiştir [88] .

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da GSBL üretim sıklığı farklılık göstermektedir. Bülüş ve arkadaşlarının 2000-2002 yılları arasında yaptıkları çalışmada, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden izole edilen *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli* suşlarındaki genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) sıklığı araştırılmış ve GSBL oranları *K. pneumoniae* izolatında %48, *K. oxytoca* izolatında %40 ve *E. coli* izolatında %14 olarak bulunmuştur. Genel GSBL pozitiflik oranı %28 olarak saptanmıştır [89].

2002 yılında Osman Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde Erben ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 100 adet *Acinetobacter* suşunda ÇDST ile GSBL üretimi araştırılmış ve GSBL pozitif izolata rastlanmamıştır [90].

Delialioğlu ve arkadaşlarının 2004 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptıkları çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının %18,3, *K. pneumoniae* suşlarının %29,7 ve *K. oxytoca* suşlarının %4,2 oranında GSBL ürettiği saptanmıştır [3].

Yetkin ve arkadaşlarının 2007 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptıkları bir çalışmada *Klebsiella* suşlarında GSBL sıklığı araştırılmış ve GSBL pozitiflik oranı *K. pneumoniae* suşunda %38,97, *K. oxytoca* suşunda %39 olarak saptanmıştır; her üç *K. ozaenae* suşunun da GSBL pozitif olduğu görülmüştür [91].

Çalışmamızda 94 adet *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşunda GSBL üretimi araştırılmış suşların 65'inin (%69) GSBL ürettiği saptanmıştır. GSBL üreten 65 suşun 42'si (%64,6) *E. coli*, 15'i (%23,1) *K. pneumoniae*, 1'i (%1,5) *K. ornithinolytica*, 4'ü (%6,2) *K. oxytoca*, 2'si (%3,1) *K. terrigena* ve 1'i (%1,5) *A. baumannii* olarak tespit edilmiştir. Suşların GSBL üretimi ÇDST ile belirlenmiştir.

GSBL saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem olan ÇDST ilk kez 1988 yılında Jarlier tarafından tanımlanmıştır. Bu test amoksisilin klavulonik asit diskine doğru genişleme görülmesi esasına dayanmaktadır. Bu testin yapılabilmesi için beta-laktamaz içeren bir antibiyotik diski ile sefalosporin diskleri yeterli olmaktadır. Amoksisilin klavulonat ve sefalosporin diskleri arasındaki uzaklık ve enzim substrat profili testin duyarlılığını önemli ölçüde etkileyebilmektedir [92, 93, 94].

ÇDST'de diskler uygun uzaklıkta yerleştirilmediğinde sinerjik etki gözlenmemiş ve bu da testin tekrarına veya sonuçların yanlış olarak negatif değerlendirilmesine sebep olmuştur.

Thomson ve Sanders yaptıkları çalışmada, ÇDST'de diskler arası mesafe 30 mm iken testin duyarlılığının %79 olduğunu, diskler arası mesafe 20 mm'ye düşürüldüğünde ise testin duyarlılığının %82'ye çıktığını saptamışlardır [95].

2000 yılında yaptıkları çalışmada Ho ve arkadaşları, ÇDST'de uzaklığın 30 mm'den 25 mm'ye yaklaştırıldığında testin duyarlılığının %83,8'den %97,9'a çıktığını saptamışlar ve kalan suşları 20 mm uzaklıkta tekrar test ettiklerinde üç suşta daha GSBL pozitifliği saptamışlardır [96].

Türkiye’de yapılan çalışmalardan Fincancı ve arkadaşlarının araştırmasında disk uzaklığının 25 mm olduğu ÇDST ile GSBL üretimi saptanan köken sayısının disk uzaklığı 30 mm olan köken sayısı ile saptanana göre anlamlı derecede fazla ($p<0.0001$) olduğu saptanmıştır [97].

Çalışmamızda ÇDST’de disk uzaklığı 30 mm olarak ayarlandığında testin duyarlılığı % 24,6, 25 mm’de ise %53,8 olarak bulunmuştur. Diskler arası uzaklık 20 mm’ye indirildiğinde duyarlılık büyük bir artış göstererek %98,4’e yükselmiştir. Elde edilen bu verilere dayanarak ÇDST’de diskler arası uzaklığın 20 mm olarak uygulanmasının doğru olacağı düşünülmüştür. Sadece *A. baumannii* suşu için testin pozitifliği 23 mm’de tespit edilmiştir. ÇDST ile GSBL üreten suşların tespitinden sonra suşların GSBL üretiminin plazmit veya kromozomal kökenli olduklarını anlamak amacıyla plazmit profilleri incelenmiş ve plazmitler akrinin oranj ile muamele edilerek tekrar ÇDST’ye alınmıştır. İncelenen çalışmalarda GSBL pozitif suşların plazmit profilleri farklılık göstermektedir.

1991 yılında Jacoby ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerinin çeşitli suşlarında GSBL üretiminden sorumlu olan plazmitlerin özellikleri araştırılmış ve GSBL genini kodlayan plazmit büyüklüklerinin 80 kb ile 300 kb arasında değiştiği saptanmıştır [65].

Güney Afrika’da 1994-1996 yılları arasında Essek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı tiplerde GSBL üreten 25 adet *K. pneumoniae* suşunun plazmit profilleri belirlenmiş ve buna göre suşların 5-186 kb büyüklükleri arasında değişen 1-7 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir [98].

2001-2002 yılları arasında Velasco ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, GSBL üreten 48 *E. coli* izolatında spesifik GSBL tipleri ve bu GSBL’leri taşıyan plazmitler araştırılmıştır. Buna göre, CTX-M tipi GSBL gösteren izolatlarda plazmit DNA büyüklüklerinin 95 kb ile 120 kb arasında, SHV tipi GSBL gösteren izolatlarda ise 60 kb ile 160 kb arasında değiştiği belirlenmiştir [99].

2007 yılında Damjanova ve arkadaşlarının Macaristan’da yaptıkları çalışmada, GSBL pozitif 128 adet *Klebsiella spp.* izolatının plazmit büyüklüklerinin 2,3 kb ile 228 kb arasında değiştiği ve izolatların 12 farklı plazmit profili gösterdiği saptanmıştır [100].

1978’de Barker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *E. coli* DNA’sında akridin oranjın (AO) etkisi incelenmiş ve *E. coli* K12 suşun pH 7,9’da inkübe edildiğinde AO’nun bakterinin gelişimini engellediği ve AO’nun F’-Lac plazmit giderimini arttırdığı saptanmıştır [101].

Arshad ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı araştırmada, AO’nun *E. coli*’de beta-laktamaz ifadesi üzerindeki mutajenik etkileri araştırılmış ve AO’ya maruz bırakılan *E. coli* hücrelerindeki beta-laktamaz inaktivasyonunda AO’nun etkili olduğu saptanmıştır. *E. coli* bakterisinin AO’ya maruz bırakılması DNA’da hızlı fakat tamir edilebilir bir hasara sebep olmaktadır [71].

Çalışmamızda *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşlarının 71 (%75,5) tanesinde plazmit DNA tespit edilmiştir. Suşların taşıdığı plazmit DNA sayısının 1–10 arasında değiştiği ve plazmit DNA büyüklüklerinin ise 0,4 kb ile >19,3 kb arasında olduğu belirlenmiştir. GSBL pozitif 65 izolatın 58 tanesinde (%89,3) plazmit DNA tespit edilmiştir. AO ile muamele edilen GSBL pozitif 58 izolatın 11 (%19) tanesinde AO uygulanan plazmit DNA bantlarında bir değişiklik görülmezken, 47 (%81) adet suşta AO’nun etkili olduğu tespit edilmiştir. Suşların plazmit DNA bantları AO uygulanmayan bantlara göre ince ve daha az sayıda gözlenirken AO uygulanan bazı plazmitlerin tamamen kaybolduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre AO’nun suşların plazmit gideriminde % 81 etkili olduğu tespit edilmiştir.

ÇDST sonuçlarına göre AO uygulanan suşların %6,9’unun AMC, CRO, CAZ, CTX ve ATM antibiyotik zon çaplarında 2-10 mm arasında değişen genişlemeler görülmüştür. Dolayısıyla AO uygulanan izolatların %6,9’unun kullanılan antibiyotiklere karşı daha az direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Bu yüzden *K. oxytoca* 52, *E. coli* 53, 56 ve 67 suşlarının GSBL enzimi üretiminin plazmit kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

AO uygulanan suşların %93,1'inde kontrol gruplarına göre antibiyotik zon çaplarının değişmediği tespit edilmiştir. Bu durum beklentilerin aksine GSBL üretiminin incelediğimiz suşlarda plazmit kökenli olamayabileceğini düşündürmektedir. Fakat yapılan kaynak araştırmalarında GSBL üretiminin çoğunlukla kromozomal kaynaklı olduğunu ifade eden bir literatüre rastlanmamıştır. AO, GSBL pozitif suşların plazmit gideriminde %81 etkili olmasına rağmen, ÇDST'de suşların % 93,1'inde GSBL üretiminde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durumun AO uygulaması sonucunda popülasyondaki tüm bakterilerin plazmitlerini yitirmemesinden veya bakterilerin plazmit DNA'larında meydana gelen hasarı tamir etmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu deney sonucunda suşların GSBL üretiminin plazmit veya kromozomal kökenli olup olmadığının anlaşılması için AO kullanımının çok yeterli olmadığı, bu yüzden bu tür çalışmalarda konjugasyon gibi daha belirgin ve ispatlanmış yöntemlerin kullanılması gerektiği saptanmıştır.

Çalışmamızda izolatların GSBL geni taşıyıp taşımadıkları ve GSBL tipleri TEM, SHV, CTX-M ve OXA primerleri kullanılarak PZR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. *E. coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşları GSBL tipleri açısından ülkeler arasında farklılık göstermektedir.

1997-2003 yılları arasında Amerika'da Dipersio ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada GSBL üreten *K. pneumoniae* suşlarının tümünde TEM-1 ve SHV-5 tipi GSBL saptanmıştır. Buna ilaveten 1998 yılında New York'dan izole edilen iki *K. pneumoniae* suşunda OXA-2 tipi GSBL bulunmuştur [25].

2001-2003 yılları arasında Matar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *E. coli* suşlarında %18 oranında TEM ve SHV, %61 oranında sadece TEM, %21 oranında ise sadece SHV tipi GSBL saptanmış, suşlarda CTX-M tipi GSBL bulunamamıştır [102].

2003 yılında Paterson ve arkadaşlarının Amerika, Tayvan, Avustralya, Güney Afrika, Türkiye, Belçika ve Arjantin'deki on iki hastaneden izole edilen *K. pneumoniae* suşları ile yaptıkları araştırmada en yaygın SHV tipi GSBL'leri %67,1 oranında, TEM tipi GSBL'leri %16,4 oranında, PER tipi GSBL'leri Türkiye'den izole edilen dokuz izolatin dördünde ve iki izolatta SHV-2 ve SHV-5 tipi GSBL'lerle birlikte tespit etmişlerdir. CTX-M tipi GSBL'ler %23,3 oranında Amerika hariç diğer ülkelerin hepsinde tespit edilmiştir [26].

2005 yılında Kore'de yapılan çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında sırasıyla %78,3 ve %60 oranında TEM tipi GSBL tespit edilmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatında TEM-52 hariç TEM tipi GSBL'lerin çoğu TEM-1 olarak bulunmuştur. *K. pneumoniae*'da SHV-12 ve CTX-M-3, *E. coli*'de CTX-M-15 ve CTX-M-3 tespit edilmiştir. İki *K. pneumoniae* izolatında ise GES-3 tipi GSBL tespit edilmiştir [44].

Çin'de 2007 yılında yapılan Yunsong Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL tipleri araştırılmış ve 509 izolatin 447'sinde GSBL genotipleri belirlenmiştir. 339 izolatta TEM tipi, 27 izolatta SHV tipi ve 341 izolatta CTX-M tipi GSBL tespit edilmiştir. 30 izolatin iki veya üç GSBL tipini birlikte taşıdığı ve CTX-M-14 ve CTX-M-3 üretiminin yaygın olduğu saptanmıştır. OXA tipi GSBL taşıyan izolat tespit edilememiştir [34].

2007 yılında İtalya'da yapılan çalışmada 470 adet *A. baumannii* izolatından 31'inin TEM-92 GSBL ürettiği saptanmıştır. TEM tipi GSBL ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Bunun dışında *A. baumannii* izolatları dünya çapında rapor edilmektedir. PER-1 Fransa, Belçika, Kore ve Türkiye'de; PER-2 Arjantin'de; VEB-1 Belçika, Fransa ve Arjantin'de; SHV-12 Çin'de ve CTX-M tipi GSBL'ler Bolivya ve Japonya'da rapor edilmiştir [31,103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112].

Çalışmamızda 94 adet izolatta PZR yöntemi ile GSBL enzimleri tiplendirilmiştir. Buna göre izolatların %50'sinin TEM tipi, %14,8'inin SHV tipi, % 11,7'sinin CTX-M tipi GSBL ürettiği saptanmıştır. İzolatların %9,6'sı hem TEM hem SHV tipi GSBL, %9,6'sı TEM ve CTX-M tipi GSBL üretmektedir. Buna rağmen TEM, SHV

ve CTX-M tipi GSBL birlikte taşıyan bir izolata rastlanmamıştır. TEM ve CTX-M tipi GSBL en sık *E. coli* suşlarında, SHV tipi GSBL ise en sık *K. pneumoniae* suşlarında saptanmıştır. GSBL pozitif suşlarda OXA tipi GSBL tespit edilememiştir. *A. baumannii* suşlarında hiçbir GSBL tipi saptanmamıştır. İzolatların GSBL tipleri tespit edildikten sonra GSBL pozitifliği ÇDST ve PZR sonuçları ile kıyaslanmıştır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda PZR sonuçlarının ÇDST'ye göre daha güvenilir olduğunu ispatlamaktadır.

2006 yılında Hindistan'da Grover ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *K. pneumoniae* izolatları iki fazda incelenmiş ve GSBL üretimi ÇDST, E-testi ve PCR yöntemleri ile kıyaslanmıştır. Buna göre 108 *K. pneumoniae* suşunun %51,8'i birinci fazda, %70,7'si ikinci fazda E-testi ve ÇDST ile GSBL pozitif olarak belirlenmiş, PZR ile belirlenen GSBL üreten suş oranının birinci fazda %65,7'ye ikinci fazda ise %88,8'e çıktığı saptanmıştır [113].

Steward ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *K. pneumoniae* suşlarında ÇDST ile belirlenen GSBL pozitiflik oranı %84,2 iken PZR ile belirlenen GSBL pozitiflik oranının %99,3 olduğu saptanmıştır [114].

Çalışmamızda ÇDST'de toplam 65 (%69) izolat GSBL pozitif iken, PZR yöntemi ile izolatların 67 tanesi (%71,2) pozitif olarak belirlenmiştir. SHV, TEM ve CTX-M tipi GSBL pozitif toplam suş sayısının 72 (%76,5) olarak saptanması bazı izolatların TEM-CTX-M veya TEM-SHV tipi GSBL'leri taşımasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, beta laktam antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımı var olan direnç mekanizmalarının artışına sebep olmakta ve bu da tedavide sorunlara yol açmaktadır. GSBL pozitif mikroorganizmalar sıklıkla diğer antibiyotiklere de direnç göstermesi ve bu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlı olması nedeniyle izole edilen mikroorganizmaların GSBL üretilip üretilmediğinin doğru olarak ve mümkün olduğunca kısa sürede saptanması gerekmektedir. GSBL salgınlarının kontrol altına alınmasında, GSBL pozitif izolat sıklığının ve GSBL tiplerinin yayılımının belirlenmesi önemlidir.

Çalışmamızda elde edilen verilere dayanarak, PZR ile ÇDST sonuçlarının duyarlılığı birbirine çok yakın olmasına rağmen, PZR yönteminin ÇDST'ye göre daha güvenilir bir yöntem olduğu ispatlanmıştır. Mikrobiyoloji laboratuvarında PZR yönteminin kullanımının zor ve zahmetli olması, ayrıca PZR'nin ekonomik boyutu, ÇDST gibi kolay, pratik, ucuz ve duyarlılığı yüksek bir yöntemin kullanılmasını daha elverişli kılmaktadır. PZR yönteminin E-testi, kombine disk, mikrodilüsyon yöntemleri gibi fenotipik testlerle GSBL varlığı saptanamayan izolatlarda bu varlığı tespit etmek amaçlı kullanılması tavsiye edilmektedir. İleride bu konuyla ilgili yapılacak olan çalışmalarda, GSBL saptanan izolatların plazmitleri araştırılıp bu plazmitlerin GSBL üretimine neden olup olmadıkları konjugasyon yöntemiyle saptanabilir. Bu konuyla ilgili ülkemizde yapılan moleküler çalışmaların çok kısıtlı olması nedeniyle daha detaylı çalışmalara yer verilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Çetin, H., Öktem, F., Örmeci, A. R., Yorgancıgil, B., Yaylı, G., “Çocukluk çağı idrar yolu enfeksiyonlarında *Escherichia coli* ve antibiyotik direnci”, **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 13 (2): 12-16 (2006).
2. Gür, D., “Temel tıptan kliniğe”, **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33 (2): 102–109, (2002).
3. Delialioğlu, N., Öcal, N. D., Emekdaş, G., “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları”, **Ankem Derg.**, 19 (2): 84-87 (2005).
4. Akçam, F. Z., Gönen İ., Kaya O., Yaylı G., “Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması”, **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 11 (1): 6–9 (2004).
5. Hoşgör, M., Özkan, F., Yapar, N., Tünger, 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) .
6. Seid, J., Asrat, D., “Occurrence of extended spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Klebsiella* species from Harar region, eastern Ethiopia”, **Acta Tropica**, 95 (2): 143-148 (2005).
7. Çelen, M. K., Ayaz, C., Geyik, M. F., Hoşoğlu, S., Uluğ, M., “Hastane kökenli Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar”, **Ankem Derg.**, 20 (3): 148-151 (2006).
8. 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) .
9. Yorgancıgil, B., “Beta-Laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları”, **Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi**, 6 (2): 177-182 (1999).
10. Demirtürk, N., Demirdal, T., “Antibiyotiklerde Direnç Sorunu”, **Kocatepe Tıp Dergisi**, 5 (2): 17-21 (2004) .
11. Jasser-Al, A. M., “Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem”, **Kuwait Medical Journal** , 38 (3): 171-185 (2006).

12. Gülay, Z., “Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç”, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 5: 210-229 (2001) .
13. Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., “Mikrobiyoloji 4. Baskı ”, *Asya Tıp Kitabevi*, İzmir, 30-31 (2005).
14. Samaha-Kfoury, J. N., Araj, G. F., “Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases”, *BMJ*, 327: 1209-1213 (2003).
15. Tanır, G., Göl, N., “Antibiyotik Direnci”, *Klinik Dergisi*, 12 (2): 47-54 (1999).
16. Demir, N., “Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (gsbl) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması”, Uzmanlık Tezi, *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 5-6 (2006).
17. Bush, K., Jacoby, G. A., Mederios, A. A., “A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure”, *Antimicrob. Agent Chemother.*, 39 (6): 1211-1233 (1995).
18. Siu, L. K., “Antibiotics: action and resistance in Gram negative bacteria”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 35: 1-11(2002).
19. İnternet: Penisilin direnci, [http:// www. nugizentrum. de/ Bilder/ Penicilin _ Lactamase_Reaktion.gif](http://www.nugizentrum.de/Bilder/Penicilin_Lactamase_Reaktion.gif) (2007).
20. Chaudhary, U., Aggarwl, R., “Extended sectrum Beta-lactamases (ESBL)- An Emerging Threat to Clinical Therapeutics”, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22 (2): 75-80 (2004).
21. Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., “Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases”, *Research in Microbiology*, 155 (6): 409-421 (2004).
22. Taşlı, H., Bahar, İ. H., “Molecular Characterization of TEM- and SHV- Derived Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Hospital-Based *Enterobacteraceae* in Turkey”, *Jnp. J. Infect. Dis.*, 58: 162-167 (2005).
23. Gülay, Z., “Gram negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası”, *Aknem. Derg.*, 19 (2): 66-77 (2005).

24. Turner, P. J., "Extended-Spectrum Beta-Lactamases", *Clinical Infectious Diseases*, 41 (4): 273-275 (2005).
25. DiPersio, J. R., Deshpande, L. M., Biedenbach, D. J., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Jones, R. N., "Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003)", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51 (1): 1-7 (2005).
26. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., Bonomo, R. A., "Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M- Type β -Lactamases", *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 47 (11): 3554-3560 (2003).
27. Morris, D., O'Hare, C., Glennon, M., Maher, M., Corbett-Feeney, G., Cormican, M., "Extended-Spectrum β -Lactamases in Ireland, Including a Novel Enzyme, TEM-102", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (8): 2572-2578 (2003).
28. Randegger, C. C., Hachler, H., "Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum Beta-Lactamases", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (6): 1730-1736 (2001).
29. Paterson, D. L., Bonomo, R. A., "Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update", *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4): 657-686 (2005).
30. Bradford, P., "Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat", *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 933-951 (2001).
31. Endimiani, A., Luzzaro, F., Migliavacca, R., Mantengoli, E., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Pagani, L., Bonomo, R. A., Rossolini, G. M., Toniolo, A., "Spread in an Italian Hospital of a Clonal *Acinetobacter baumannii* Strain Producing the TEM-92 Extended-Spectrum β -Lactamase", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (6): 2211-2214 (2007).
32. Bauernfeind, A., Schweighart, S., Grimm, H., "A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*", *Journal of Infection*, 18 (5): 294-298 (1990).

33. Bonnet, R., "Growing Group of Extended-Spectrum Beta Lactamases: the CTX-M Enzymes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1): 1-14 (2004).
34. Yu, Y., Ji, S., Chen, Y., Zhou, W., Wei, Z., Li, L., Ma, Y., "Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China", *Journal of Infection*, 54 (1): 53-57 (2007).
35. Bonnet, R., Sampaio, J. L. M., Labia, R., Champs, C. D., Sirot, D., Chanel, C., Sirot, J., "A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaximeresistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1936-1942 (2000).
36. Tzouveleakis, L. S., Gazouli, M., Markogiannakis, A., Paraskaki, E., Legakis, N. J., Tzelepi, E., "Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases", *J. Antimicrob. Chemother.*, 42 (2): 273-275 (1998).
37. Gniadkowski, M., Schneider, I., Palucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., Bauernfeind, A., "Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (4): 827-832 (1998).
38. Bi, S., Qiao, C., Song, D., Tian, Y., Gao, D., Sun, Y., Zhang, H., "Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe", *Sensors and Actuators B*, 119 (1): 199-208 (2006).
39. Paterson, D. L., "Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*", *The American Journal of Medicine*, 119 (6): 20-28 (2006).
40. Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R., "Inhibitor resistance TEM beta lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics", *J. Antimicrob. Chemoter.*, 43: 447-458 (1999).
41. Gür, D., "GSBL'lerin genel özellikleri ve GSBL tipleri: genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar", Köksal İ. (ed), *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 5-12 (2004).
42. Thomson, K. S., Moland, E. S., "Version 2000: the new beta lactamases of gram negative bacteria at the dawn of the new millenium", *Microbes and Infection*, 2: 1225-1235 (2000).

43. Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodriguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D., Couto, E., Gutkind, G., "Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (9): 2864–2867 (2003).
44. Ryoo, N. H., Kim, E.-C., Hong, S. G., Park, Y. J., Lee, K., Bae, K., Song, E. H., Jeong, S. H., "Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum b-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 698–702 (2005).
45. İnternet: Çift disk sinerji testi, <http://www.bloodystudy.nl/home/item.php>, (2007).
46. Gülay, Z., "ESBL'lerin tanı yöntemleri", Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, Ünal, S., Vahaboğlu, H., Leblebicioğlu, H., Öztürk, R., Köksal, İ. (eds.), *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 13-26 (2004).
47. Sanders, C. C., Barry, A. L., Washington, J. A., Shubert, C., Moland, E. S., Traczewski, M., Knapp, C., Mulder, R., "Detection of extended-Spectrum Beta-Lactamase- producing Members of the Family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL Test", *J. Clin. Microbiol.*, 34 (12): 2997-3001 (1996).
48. Arı, Ş., "DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması", Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan, G., Arda, N. (eds.), *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 101-107 (2004).
49. İnternet: Polimeraz zincir reaksiyonu http://www.njuliantrubin.com/encyclopedia/biochemistry/pcr_files/Pcr.png (2007).
50. Berk, L. S., Pappas J., Santa, M. D., Lewis, J., "Evulation of the ligase chain reaction, Abbot LCX tm prob systemfor prevention containment of DNA sample contamination", *Clin. Chem.*, 42 (6): 198-205 (1996) .
51. Andrews, W. W., Lee, H. H., Roden, W. J., Mott, C. W., "Detection of genitorunary tract *Chlamidya trachomatis* infection in pregnant woman by ligase chain reaction assay", *Obstet. Gynecol.*, 87: 556-560 (1997).

52. Dean, D., Ferrero, D., McCharthy, M., “Comparison of performance and cost-effectiveness of direct fluorescent-antibody, ligase chain reaction, and PCR assays for verification of chlamydial enzyme immunoassays result for populations with at a low to moderate prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection”, **J. Clin. Microbiol.**, 36: 94-99 (1998).
53. Sambrook, J., Russell, D. W., “Molecular Cloning A Laboratory Manual 3th ed.”, **Cold Spring Harbor**, New York, 12.3– 8.27 (2001).
54. Bahçeci, Z., “Moleküler Biyoloji 2. Baskı”, **Öğrenci Kitabevi Yayınları**, Kırşehir, 290-293 (2002).
55. Ensari, N. Y., “Moleküler Biyoloji 1. Baskı”, **D. Ü. Basımevi Müdürlüğü**, Diyarbakır, 122-124 (2002).
56. İnternet: Sanger DNA dizi analizi, <http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/GEP/Lecture15/Image31.gif> (2007).
57. İnternet: Maxam-Gilbert metodu ile oligonükleotit dizileme, <http://www.nd.edu/~aseriann/maxam.gif> (2007).
58. Durmaz, R., “Moleküler Epidemiyoloji, Uygulamalı Moleküler Biyoloji 2. Baskı”, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya, **Nobel Tıp Kitabevi**, 130-158 (2001).
59. Bilgehan, H., “Temel Mikrobiyoloji Bağışıklık Bilimi”, **Barış yayınları**, İzmir, 170-178 (2002).
60. Vahaboğlu, H., Fuzi, M., Cetin, S., Gundeş, S., Ujhelyie, E., Coşkunkan, F., Tansel, O., “Characterization of Extended-Spectrum b-Lactamase (TEM-52)-Producing Strains of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium with Diverse Resistance Phenotypes”, **Journal of Clinical Microbiology**, 39 (2): 791–793 (2001).
61. Stürenburg, E., Mack, D., “Extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control”, **Journal of Infection**, 47 (4): 273–295 (2003).
62. İnternet: pBR322 plazmiti, <http://www.macvector.net/Images/Resources/pbr322.jpeg> (2007).
63. İnternet: Transpozon, http://www.uiduk.ac.kr/~kchan/01lecture/013_biology/13_week/dnatech01/1201transposon.JPG (2007).

64. Jacoby, G. A., "Genetics of extended-spectrum beta lactamases", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 13 (1): 2-11 (1994).
65. Jacoby, G. A., Sutton, L., "Properties of Plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases", *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 35 (1): 164-169 (1991).
66. Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P. H., "Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 13 (1): 17-29 (1994).
67. Sabolova, D., Kozurkova, M., Kristian, P., Danihel, I., Podhradsky, D., Imrich, J., "Determination of the binding affinities of plasmid DNA using fluorescent intercalators possessing an acridine skeleton", *International Journal of Biological Macromolecules*, 38 (2): 94-98 (2006).
68. Sharma, V. K., Sahare, P. D., Rastogi, R. C., Ghoshal, S. K., Mohan, D., "Excited state characteristics of acridine dyes: acriflavine and acridine orange", *Spectrochimica Acta Part A*, 59 (8): 1799-1804 (2003).
69. Akman, M., "Bakteri Genetiği", *Cumhuriyet üniversitesi Tıp fakültesi yayını 2. Baskı*, Sivas, 145-529 (1983).
70. Lauretti, F., Melo, L. D., Benati, F. J., Volotao, E. M., Santos, N., Linhares, R. E. C., Nozawa, C., "Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels", *Journal of Virological Methods*, 114 (1): 29-35 (2003).
71. Arshad, R., Farooq, S., Iqbal, N., Ali, S. S., "Mutagenic effect of acridine orange on the expression of penicillin G acylase and β -lactamases in *Escherichia coli*", *The society for Applied Microbiology Letters in Applied Microbiology*, 42 (2): 94-101 (2006).
72. Frenster, J. H., "Electron Microscopic Localization of Acridine Orange Binding to DNA within Human Leukemic Bone Marrow Cells", *Cancer Research*, 31: 1128-1133 (1971).
73. Luchowski, R., Krawczyk, S., "Stark effect spectroscopy of exciton states in the dimer of acridine orange", *Chemical Physics*, 293 (1): 155-166 (2003).
74. Günalp, A., Yılmaz, A. Y., Pınar, A., "Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvar eğitimi kitabı", *Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Basımevi*, Ankara, 90-98 (2003).
75. Logan, N. A., Berkeley, R. C. W., "Identification of *Bacillus* strains using the API system", *Journal of General Microbiology*, 130 (7): 1871-1882 (1984).

76. Altındış, M., Fıçıcı, S. E., Çetinkol, Y., Dülgenbaki, S., “Povidon-İyot Klorheksidin Glukonat, Gluteraldehit ve Oktenidin Hidrokloridin Nozokomiyal *Acinetobacter baumannii* suşlarına etkinliği”, *Ankem derg.*, 18 (2): 97-100 (2004).
77. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon, A., “Extended broad-spectrum beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns”, *Rev. Infect. Dis.*, 10 (4): 867-878 (1989).
78. Philippon, A., Labia, R., Jacoby, G., “Extended-spectrum beta-lactamases”, *Antimicrob. Agent Chemother.*, 33 (8): 1131-1136 (1989).
79. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., “In Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, *Cold Spring Harbor*, New York, 1-25 (1989).
80. Elder, J. K., Southern, E. M., “Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for plating mobility of fragment length”, *Analytica Biochemistry*, 170: 38-44 (1983).
81. Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Güereca, L., Bravo, A., “Specific PCR Primers Directed To Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection”, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11): 3826–3831 (1995).
82. Kimura, S., Ishii, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K., “Predictive analysis of ceftazidime hydrolysis in CTX-M-type β -lactamase family members with a mutational substitution at position 167”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3): 326-331 (2007).
83. Timko, J., “Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella spp.* strains”, *J. Infect Chemother*, 10 (4): 212-215 (2004).
84. Delton, M., “*Enterobacteriaceae*”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3): 9–22 (2007).
85. Romero, L., Lopez, L., Rodriguez-Bano, J., Hernandez, J. R., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., “Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases”, *Clin Microbiol Infect*, 11 (8): 625–631 (2005).
86. Jeong, S. H., Bae, I. K., Kwon, S. B., Lee, J. H., Jung, H. I., Song, J. S., Jeong, B. C., Kim, S.-J., Lee, S. H., “Investigation of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea”, *Letters in Applied Microbiology*, 39 (1): 41–47 (2004).

87. Paterson, D. L., Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P.-R., Woods, G. L., Satishchandran, V., Snyder, T. A., Harvey, C. M., Tepler, H., DiNubile M. J., Chow J. W., "In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6): 965–973 (2005).
88. Sinha, M., Srinivasa, H., Macaden, R., "Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in *Acinetobacter* species", *Indian J. Med. Res.*, 126: 63-67 (2007).
89. Bülüç, M., Gürol, Y., Bal, Ç., "Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Oranları: 2000-2002", *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 33: 31-34 (2003).
90. Erben, N., Kiremitçi, A., Özgüneş, İ., "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ve İndüklenebilir Beta-Laktamaz Sıklığının ve Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi", *Osmangazi Tıp Dergisi*, 28 (3): 135-146 (2006).
91. Yetkin, G., Çalışkan, A., Özen, M., "Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Klebsiella* suşlarının sıklığı", *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 37 (2) :128-130 (2007).
92. Gülay, Z., Biçmen, M. K., Yuluğ, N., "Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi", *Ankem Derg.*, 12 (4): 514-521 (1998).
93. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon A., "Extended broad-spectrum beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactam agents in Enterobacteraceae: hospital prevalence and susceptibility patterns", *Rev. Infect. Dis.*, 10 (4): 867-878 (1989).
94. Sirot, S., "Detection of extended spectrum plasmid mediated beta lactamases by disk diffusion", *Clin. Microbial. Infect.*, 2 (1): 35-42 (1996).
95. Thomson, K. S., Sanders C. C., "Detection of extended-spectrum beta lactamases in members of the family *Enterobacteraceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests", *Antimicrob. Agent Chemother.*, 36 (9): 1877-1882 (1992).
96. Ho, P. L., Tsang N. C., Que T. L., Ho, M., Yuen, K. Y., "Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in hong Kong", *APMIS*, 108: 237-240 (2000).

97. Fincancı, M., Ulutürk, R., Eren, G., Konuksal, C., Soysal, F., Sander, S., Boztaş, Z., “*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Escherichia coli* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamazların araştırılmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması”, ***İnfeksiyon Dergisi***, 17 (1): 55-60 (2003).
98. Essack, S. Y., Hall, L. M. C., Pillay, D. G., Mcfadyen, M. L., Livermore, D. M., “Complexity and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated in 1994 and 1996 at a Teaching Hospital in Durban, South Africa”, ***Antimicrob. Agent Chemother.***, 45 (1): 88-95 (2001).
99. Velasco, C., Romeroa, L., Martinez, J. M. R, Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., “Analysis of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalised patients in Seville”, ***International Journal of Antimicrobial Agents***, 29: 89–92 (2007).
100. Damjanova, I., Toth, A., Paszti, J., Jakab, M., Milch, H., Bauernfeind, A., Fuzi, M., “Epidemiology of SHV-type beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids”, ***International Journal of Antimicrobial Agents***, 29 (6): 665–671 (2007).
101. Barker, G. R., Hardman, N., “The effects of acridine orange on deoxyribo nucleic acid in *Escheichia coli*”, ***Biochem. J.***, 171: 567-573 (1978).
102. Matar, G. M., Khodor, S. A., El-Zaatari, M., Uwaydah, M., “Prevalance of genes encoding extended-spectrum beta lacamases in *Escherichia coli* resistance to beta lactam and non-beta lactam antibiotics”, ***Annals of Tropical Medicine & Parasitology***, 99 (4): 413-417 (2005).
103. Naas, T., Bogaerts, P., Bauraing, C., Degheldre, Y., Glupczynski, Y., Nordmann, P., “Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium”, ***J. Antimicrob. Chemother.***, 58: 178–182 (2006).
104. Poirel, L., Karim, A., Mercat, A., Le Thomas, I., Vahaboglu, H., Richard, C., Nordmann, P., “Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolates from a patient in France”, ***J. Antimicrob. Chemother.***, 43 (1): 157–158 (1999).
105. Vahaboglu, H., Öztürk, R., Aygün, G., Coskunkan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., Oktun, M., “Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamase among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study”, ***Antimicrob. Agents Chemother.***, 41 (10): 2265–2269 (1997).

106. Jeong, S. H., Bae, I. K., Kwon, S. B., Lee, K., Yong, D., Woo, G. J., Lee, J. H., Jung, H. I., Jang, S. J., Sung, K. H., Lee, S. H., "Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum beta- lactamase in an intensive care unit", *Journal of Hospital Infection*, 59 (3): 242–248 (2005).
107. Carbonne, A., Naas, T., Blanckaert, K., Couzigou, C., Cattoen, C., Chagnon, J.-L., Nordmann, P., Astagneau, P., "Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta -lactamase in a hospital setting", *J. Hosp. Infect.*, 60 (1): 14–18 (2005) .
108. Pasteran, F., Rapoport, M., Petroni, A., Faccone, D., Corso, A., Galas, M., "Emergence of PER-2 and VEB-1 a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas.", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 (9): 3222–3224 (2006).
109. Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., Nordmann, P., "Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital", *J. Clin. Microbiol.*, 41 (8): 3542– 3547 (2003).
110. Huang, Z. M., Mao, P. H., Chen, Y., Wu, L., Wu., J., "Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple- drug-resistant *Acinetobacter baumannii*", *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 25 (5): 425–427 (2004).
111. Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G., Perili, M., "Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals", *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 (5) : 975–978 (2006).
112. Nagano, N., Nagano, Y., Cordevant, C., Shibata, N., Arakawa, Y., "Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward", *J. Clin. Microbiol.*, 42 (9) : 3978–3984 (2004).
113. Grover, S., Sharma, M., Chattopadhy, D., Kapoor, H., Pasha, S., Singh, G., "Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin", *Journal of Infection*, 53 (4): 279-288 (2006).

114. Steward, C. D., Rasheed, J. K., Susannah, K. U., Biddle, J. W., Raney, P. M., Anderson, G. J., Williams, P. P., Brittain, K. L., Oliver, A., McGowan, J. E., Tenover, J. R., Tenover, F. C., "Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended spectrum beta-lactamases detection methods", *J. Clin. Microbiol.*, 39 (8): 2864-2872 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BALI, Elif Burcu
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 28.06.1983 Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 482 81 44
 e-mail : e.burcubali@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Ayrancı Süper Lisesi	2001

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006–2007	Gazi Üniversitesi	Sözleşmeli Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Seyahat etmek, müzik dinlemek, kitap okumak, fotoğraf çekmek