T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI

TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU

İSTANBUL İLİ ANADOLU KUZEY KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ
GENEL SEKRETERLİĞİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ENTEROBACTERİACEAE AİLESİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ENZİMİNİN CLSI VE EUCAST KRİTERLERİNE GÖRE TESPİTİ VE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. HANDE TOPTAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SEBAHAT AKSARAY

İSTANBUL – 2017



T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI

TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU

İSTANBUL İLİ ANADOLU KUZEY KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ GENEL SEKRETERLİĞİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ENTEROBACTERİACEAE AİLESİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ENZİMİNİN CLSI VE EUCAST KRİTERLERİNE GÖRE TESPİTİ VE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. HANDE TOPTAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SEBAHAT AKSARAY

İSTANBUL – 2017

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar sayı ve yaygınlıkları giderek artan, beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotiklerin kullanım alanlarını sınırlayan önemli bir direnç kaynağıdır. GSBL üretiminin doğru bir şekilde saptanmasında, kullanılacak yöntem ve değerlendirme kriterleri son derece önemlidir. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan iki standart CLSI ve EUCAST'tir. Bu çalışmada bu iki standartın GSBL tespitine yönelik duyarlılık ve özgüllüklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza Nisan 2014-Temmuz 2014 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen idrar örneklerinden moleküler olarak GSBL ürettiği belirlenen 76 ve kontrol olarak GSBL negatif 74 izolat dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan bütün izolatların disk difüzyon yöntemiyle tarama ve fenotipik doğrulama testleri (çift disk sinerji ve kombinasyon diski yöntemi) ile moleküler doğrulama testleri çalışılmıştır. Tarama testleri için seftazidim (10µg ve 30µg), sefotaksim (5µg ve 30µg), seftriakson (30µg), sefpodoksim (10µg), sefepim (30µg) ve aztreonam (30µg) diskleri kullanılmıştır. Çift disk sinerji testi için tarama diskleri amoksisilin-klavulonat (20+10µg) diski ile merkezden merkeze 20mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kombinasyon disk yöntemi için seftazidim-klavulonat (30+10µg) ve sefotaksim-klavulonat (30+10µg) diskleri kullanılmıştır. Moleküler doğrulama testi için CTX-M, TEM ve SHV gen bölgelerinin varlığı konvansiyonel PZR ile saptanmıştır.

Çalışmamızda GSBL üreten izolatların %86.8'i CTX-M, %47.4'ü TEM ve %9.2'si SHV olarak bulunmuştur. Bazı izolatlarda birden fazla direnç geni saptanmıştır. GSBL üreten izolatların beta laktam duyarlılıkları CLSI ve EUCAST kriterleri kullanılarak sırasıyla seftazidim için %29.2 ve %19.7, sefepim için %14.5 ve %15.8, aztreonam için %2.6 ve %13.2 olarak bulunmuştur. GSBL tarama testi için duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi disk EUCAST kriterlerine göre yorumlanan sefpodoksim diski olarak saptanmıştır. Bunu CLSI kriterleriyle yorumlanan sefpodoksim, ve her iki kriterin de benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdiği sefotaksim ve seftriakson diskleri izlemiştir.

GSBL üretiminin tespitinde CLSI ve EUCAST kriterlerinin birbirine anlamlı bir üstünlüğü saptanmamıştır. EUCAST'in seftazidim ve sefotaksim için tarama ve doğrulama disk difüzyon testlerinde farklı içeriklerde diskler önermesinin özellikle seftazidimde duyarlılık artışını sağlamakla birlikte pratikte kullanım zorluğuna sebep olacağını düşünmekteyiz. Her iki standart için de tarama testlerinde sefpodoksim, sefotaksim veya seftriakson; doğrulama testlerinde ise sefotaksim ve sefotaksim-klavulonat disklerinin kullanılması daha doğru sonuç verilmesini sağlayacaktır.

ABSTRACT

Expanded spectrum beta-lactamases are one of the important source of resistance with an increasing number and prevalance that are limiting the using areas of beta-lactam antibiotics by hidrolising them. The method to be used as an evaluation criteria for accurate detection of ESBL production is extremely important. The two most widely standards in use for determining antibiotic susceptibility are CLSI and EUCAST. This study aimed to investigate the sensitivity and specificity of these standards for detection of ESBL.

This study includes 76 moleculary characterised ESBL producer strains and 74 ESBL negative control strains which were isolated from urine specimens that sent to Medical Microbiology Laboratory of Haydarpasa Numune Training and Research Hospital from April 2014 to July 2014. Screening and phenotypic confirmation tests (Double disk synergy and combination disk method) by disk diffusion method and molecular confirmation tests were conducted for all strains taken into study. For screening tests ceftazidime (10µg ve 30µg), cefotaxime (5µg ve 30µg), ceftriaxone (30µg), cefpodoxime (10µg), cefepime (30µg) ve aztreonam (30µg) disks were used. For double disk synergy test, screening disks were placed at a distance of 20 mm from the center of amoxicillin-clavulanate (20+10µg) disk. For combination disk method ceftazidime-clavulonate (30+10µg) and cefotaxime-clavulonate (30+10µg) disks are used. For molecular confirmation tests CTX-M, TEM and SHV resistance genes were investigated by conventional PCR.

In our study ESBL producing isolates were found 86.8% as CTX-M, 47.4% as TEM and 9.2% as SHV. More than one resistance gene was detected in some isolates. Beta-lactam susceptibilities of ESBL producers with CLSI criteria and EUCAST criteria were 29.2% and 19.7% for ceftazidime, 14.5% and 15.8% for cefepime, 2.6% and 13.2% for aztreonam respectively. Among the screening disks, cefpodoxime disk (interpreted by the EUCAST criteria), showed the highest sensitivity and specificity. This was followed by cefpodoxime disk interpreted by CLSI criteria and by cefotaxime and ceftriaxone disks with similar sensitivity and specificity for both criteria.

There was no significant difference between CLSI and EUCAST criteria in determining ESBL production. The suggestion of EUCAST that using different disks for screening and confirmation tests increases the sensitivity of detecting ESBL, especially in ceftazidime, however we believe it might cause practical difficulties. For both standarts the use of cefpodoksime, cefotaxime or ceftriaxone disks in screening tests and the use of cefotaxime and cefotaxime-clavulonate disks in confirmation tests will provide more accurate results.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konu seçiminden tezin yazım aşamasına kadar her alanda beni cesaretlendiren, her soruma cevap, her problemime çözüm bulan, iş ahlakı ve insan ilişkilerini kendime örnek aldığım, değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Sebahat AKSARAY'a,

Her başım sıkıştığında desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini bizden esirgemeyen sayın Doç. Dr. Rıza ADALETİ'ye,

Çalışmamın karanlık noktalarına ışık tutarak bana moleküler çalışmanın zevkini tattıran sayın Prof. Dr. Barış OTLU'ya,

Sorularıma sabırla cevaplar bulan Uzm. Dr. Gülçin BALKÖSE ve Uzm. Dr. Özlem DOĞAN'a, ve tezimin çalışılması sırasında içtenlikle bana yardım elini uzatan Uzm. Dr. Melike BEDİR'e,

Sağladıkları huzurlu çalışma ortamı ve dostluklarıyla her işimi kolaylaştıran sevgili asistan arkadaşlarıma,

Başta Aynur KALAYLI ve Aysel CAN olmak üzere asistanlığın süresince çok desteklerini gördüğüm değerli teknisyen arkadaşlarıma,

Beni yetiştiren, başarıya verdiği önem ve çalışma disipliniyle her zaman çocuklarına örnek olan canım babam Abdurrahman ÇAKAR'a ve her türlü fedakarlıkla beni bugünlere getiren güzel annem Nurver ÇAKAR'a, ayrıca torunlarına olan ilgi ve sevgileriyle herdaim destekçim olan eşimin ailesine,

Manevi desteği ile yanımda olan hayat arkadaşım Fatih TOPTAN'a, kardeşlerime ve tez yazım sürecinde zamanlarından çaldığım, en kıymetlilerim, yavrularım Bahar ve Mert'e

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **viii**
KISALTMALAR ..... **ix**
1.GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2.GENEL BİLGİLER **3**
2.1.Enterobacteriaceae **3**
2.2.Beta-laktam antibiyotikler **9**
2.3.Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları **13**
2.4.Beta-Laktamazların Sınıflandırılması **16**
2.5.GSBL'lerin Tarihçesi **17**
2.6.GSBL Tipleri **19**
2.7.GSBL Sentezleyen Bakterilerin Klinikte Neden Olduğu Sorunlar **23**
2.8.GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı **24**
3.MATERYAL ve METOT **30**
3.1.İzolatların tanımlanması ve saklanması **31**
3.2.Fenotipik tarama ve doğrulama testleri **31**
3.3.Genotipik doğrulama testi **33**
3.4.İstatistiksel İncelemeler **38**
4.BULGULAR **39**
5.TARTIŞMA **58**
6.SONUÇ VE ÖNERİLER **67**
7.KAYNAKLAR **69**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Beta laktam grubu antibiyotiklerin halka yapıları…….10

Şekil 2: Kombinasyon disk yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü……..26

Şekil 3: Çift disk sinerji yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü……26

Şekil 4: Gradient şerit yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü…….…….27

Şekil 5: 18 saatlik inkübasyon sonunda GSBL üreten *E.coli* izolatının antibiyogram plak görüntüsü……..33

Şekil 6: DNA ekstraksiyonu için izolatların kaynatılması…….……34

Şekil 7: Elektroforez sonunda bantların translüminatördeki görüntüsü…..……..37

Şekil 8: Sefepim CLSI/ sefepim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu..…….43

Şekil 9: Seftriakson CLSI/ seftriakson EUCAST moleküler GSBL uyumu……..45

Şekil 10: Seftazidim CLSI/ seftazidim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu.……47

Şekil 11: Sefotaksim CLSI/ sefotaksim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu...….49

Şekil 12: Sefpodoksim CLSI/ sefpodoksim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu…….51

Şekil 13: Aztreonam CLSI/ aztreonam EUCAST ile moleküler GSBL uyumu...….53

Şekil 14: Tarama testlerinin duyarlılıkları…….55

Şekil 15: Tarama testlerinin özgüllükleri……...55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Beta laktamazların fonksiyonel ve moleküler sınıflandırması……17

Tablo 2: CLSI/EUCAST Tarama Kriterleri……...25

Tablo 3: Kullanılan Primerler ve Büyüklükleri…….35

Tablo 4: Demografik Özelliklerin Dağılımı……...39

Tablo 5: Bakterilerilerin türleri ve kliniklere göre dağılımları……..40

Tablo 6: GSBL direnç genlerinin bakteri türlerine göre dağılımları…….40

Tablo 7: GSBL üreten bakterilerin CLSI ve EUCAST kriterlerine göre bazı beta laktam antibiyotiklere duyarlılık oranları……....41

Tablo 8: Sefepim CLSI/ sefepim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu…….…42

Tablo 9: Seftriakson CLSI/ seftriakson EUCAST moleküler GSBL uyumu…...…44

Tablo 10: Seftazidim CLSI/ seftazidim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu..….46

Tablo 11: Sefotaksim CLSI/ sefotaksim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu…..48

Tablo 12: Sefpodoksim CLSI/ sefpodoksim EUCAST ile moleküler GSBL uyumu…….50

Tablo 13: Aztreonam CLSI/ aztreonam EUCAST ile moleküler GSBL uyumu..…52

Tablo 14: Moleküler GSBL ile tarama testlerinin uyumu……...…..54

Tablo 15: CZC/ CTC ile moleküler GSBL uyumunun değerlendirilmesi…….56

Tablo 16: GSBL pozitif izolatlarda doğrulama testlerinin duyarlılıkları……..57

KISALTMALAR

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

AMDT: Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECA: Enterobacterial Commmon Antigen

LPS: Lipopolisakkarid

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

TEM: Temoniera

SHV: Sulfhydryl variable

OXA: Oxacillin-hydrolysing

CTX-M: Cefotaxime-Munich

IRT: Inhibitor resistant TEM

PER: Pseudomonas extended resistance

GES: Guiana extended spectrum

CAZ: Seftazidim

CRO: Seftriakson

CTX: Sefotaksim

ATM: Aztreonam

CPD: Sefpodoksim

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

ATCC: American Type Culture Collection

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MALDİ-TOF: Matrix assisted laser desorption ionization- time of flight

AMC: Amoksisilin-klavulonat

FEP: Sefepim

CZC: Seftazidim-klavulonat

CTC: Sefotaksim-klavulonat

TAE: Tris-Asetat-EDTA

UV: Ultraviyole

ESCMİD: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ÇDS: Çift disk sinerji

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar sayı ve yaygınlıkları giderek artan, beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotiklerin kullanım alanlarını sınırlayan önemli bir direnç kaynağıdır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), mikrobiyolojik olarak oksiimino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadırlar.

GSBL üreten bakteriler, bu enzimleri türler arasında aktararak hastanelerde salgınlar oluşturabilmektedir. GSBL'ler karbapenemler dışındaki beta-laktam antibiyotikleri hidrolizle etkisizleştirebildiğinden özellikle *Klebsiella* türleri ve *E.coli* başta olmak üzere Gram negatif bakterilerle olan enfeksiyonlarda ciddi tedavi sorunları ile karşı karşıya kalınmaktadır. Ayrıca GSBL üretiminden sorumlu genlerle diğer direnç genlerinin aynı plazmidlerle taşınmasına bağlı olarak GSBL üreten suşlar çoklu antibiyotik direncine sahip olmaktadır. Bu enzimlerin varlığı özellikle bakteriyemilerde saptanan yüksek morbidite ve mortalite oranları ile de ilişkilidir. GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarında; tedavide birçok antibiyotiğin etkisiz kalabilmesi, hastanede yatış süresinin uzaması, artan morbidite ve mortalite oranları ve ciddi ekonomik kayıplar nedeniyle etkenin GSBL oluşturup oluşturmadığı bilinmelidir.

GSBL üretiminin doğru bir şekilde saptanabilmesinin gerekliliği nedeniyle GSBL tespitinde kullanılacak yöntem önem kazanmaktadır. Tüm dünyada antibiyotik duyarlılıkları belirli standartlara göre yapılmaktadır ve bu standartlar arasında en yaygın olarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kullanılmaktadır. Ülkemizde antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (AMDT) uygulanışında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde uzun yıllardır CLSI standartları kullanılmaktadır. Ancak EUCAST'ın tüm dokümanlarına serbest erişim sağlaması, coğrafi yakınlığımız nedeniyle direnç profillerimizin ve duyarlılık paternlerimizin Avrupa izolatlarına daha yakın olabileceği öngörüsü ve Türkiye'nin çapında

uluslararası sürveyans çalışmalarına katılabilmesi gibi sebeplerden dolayı Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında EUCAST standartlarına geçilmesi planlanmaktadır.

EUCAST ve CLSI'ın bazı disk içerikleri, kullanılacak besiyerleri, bazı bakteri ve antibiyotik kombinasyonları için duyarlılık sınırdeğerleri açısından birtakım farklılıkları mevcuttur. Bu farklardan biri de Enterobacteriaceae ailesine mensup bakterilerin GSBL üretiminin araştırılmasında kullanılan disklerin içeriği ve duyarlılık sınırdeğerleridir. Bu durumun sonuç raporunda önemli farklılıklara yol açabileceği düşüncesinden yola çıkarak, çalışmamızda CLSI ve EUCAST standartlarının moleküler yöntemle kıyaslanarak Enterobacteriaceae ailesine mensup bakterilerde GSBL üretimini saptayabilme özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae; insanda enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilen çok sayıda bakteri cinsini ve türünü içeren bir bakteri ailesidir. Bu ismi "enterik bakteriler" olarak Türkçeleştirmek mümkün olmasına karşın bu şekilde kullanmak bir anlam karmaşası yaratmaktadır. Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler yalnızca barsakta bulunmaz ya da barsakta bulunan bakterilerin hepsi Enterobacteriaceae ailesinden değildir. Bu ailedeki bakterilerin bazıları insan ve hayvanların kalın barsağında daima bulunurlar ancak normal floranın çok küçük bir kısmını oluştururlar. Örneğin, *Bacteroides* cinsi anaerop bakterilerin normal barsak florasındaki sayısı Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin 1000 katı kadardır. Ayrıca bu ailedeki bakterilerin birçoğu insan ve hayvanların barsak ve barsak dışı floralarında, bitkilerde, toprakta, suda; patojen, kommensal ya da saprofit olarak bulunurlar. Bu gruptaki bakteriler potansiyel patojen bakteriler olarak kabul edilirler ve insanlarda septisemi, menenjit, yara enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni gibi çeşitli doku ve organları tutan enfeksiyonlara neden olurlar. Enterobacteriaceae ailesinde bulunan bakteriler aynı zamanda, önemli hastane enfeksiyonlarından etken olarak sıklıkla izole edilmektedirler (1-4).

2.1.1.Sınıflandırma

Mikrobiyoloji alanında yapılan ilk sınıflandırmalarda bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önüne alınmıştır. Ancak yeni teknolojilerden yararlanan yeni tanımlama yöntemlerinin kullanıma girmesiyle birlikte bakterilerin tanımlanmasında yenilikler ve buna bağlı olarak da sınıflandırmada birtakım değişiklikler olagelmiştir. Moleküler tekniklerin gelişmesini takiben nükleik asit hibridizasyon, DNA sekans yöntemi gibi yeni tekniklerle aile içindeki bakterilerin evrimsel geçmişini ve diğer kökenlerle yakınlıklarını belirlemek mümkün olmuştur.

Bu araştırmalarla birçok yeni tür tanımlanmış, birçok bakterinin sınıflandırmadaki yeri değiştirilmiştir (1,4,5).

Bakteriyolojinin diğer alanlarında olduğu gibi; mikrobiyoloji alanındaki gelişmelerle birlikte, özellikle moleküler mikrobiyolojik tekniklerin daha fazla kullanılmasıyla ilgili olarak Enterobacteriaceae ailesinin üyelerinin sınıflandırılmasında da cins, tür, alttür, biyogrup, ve serotip düzeyinde değişiklikler olmaktadır. Örneğin daha önce *Pasteurella pestis* ve *P.pseudotuberculosis* gibi Pasteurellaceae ailesinde bulunan türler *Yersinia* cinsine konularak Enterobacteriaceae ailesine geçirilmiştir. Ailede bulunan diğer pek çok cins ve türlerin isimlendirilmesinde ya da sınıflandırılmasında değişiklikler olmuştur (1,2).

Enterobacteriaceae ailesi; Proteobacteria şubesinin Gammaproteobacteria sınıfında, Enterobacteriales takımının içinde yer alan tek ailedir. Enterobacteriaceae ailesindeki cins sayısı 1960'larda 10-12 olarak bilinirken, 1985 yılında 22 cinse ait 69 tür ve 29 adlandırılmamış biyogrup tanımlanmıştır. Günümüzde bu ailede 50 den fazla cins tanımlanmıştır (6).

2.1.2.Morfoloji

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler Gram negatif, genellikle homojen boyanan, 2-3 µm boyunda, 0.3-1.0 µm eninde, uçları yuvarlak görünümlü, çomak şekilli bakterilerdir. Aside dirençli boyanmazlar ve spor oluşturmazlar. Ancak çeşitli istisnalar da vardır. Örneğin; *Yersinia pestis* ve *Y.pseudotuberculosis* daha küçük ve polikromatik boyanan kokobasil görünümünde bakterilerdir. *Klebsiella* cinsindekiler ise daha iri görünümdedir. *E.coli* ise eskimiş kültürlerinde ve bazı klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda uzun filamanlar oluşturmuş şekilde görülebilir. *Klebsiella, Shigella, Leminorella, Moellerella* cinsleri, *Salmonella* cinsine ait bazı serovarlar ve *Yersinia pestis* türü hareketsiz; diğer bütün üyeler hareketlidir. *Y.enterocolitica* ve *Y.pseudotuberculosis* 37°C de üretildiğinde hareketsiz oda ısısında üretildiğinde ise hareketlidir. *Proteus* cinsindeki bakteriler ise katı besiyerinin yüzeyinde yayılacak kadar hareketlidir (1,4,7).

2.1.3.Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin tümü fakültatif anaeroptur. İnsan ve hayvanlardan izole edilen türler için optimum üreme sıcaklığı 35-37°C olmasına rağmen, özellikle bitkilerde ve doğada bulunan türler daha düşük sıcaklıklarda ürerler. Genel olarak üreme sıcaklık sınırları 15-44°C olarak kabul edilir. *E.coli* 44°C'de, *Serratia* ve *Yersinia* türleri 1°C'de yavaş da olsa üreyebilir. Geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmeleri bu bakterilerin karışık ortamlardan izole edilmesinde yararlanılan özellikleridir.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler herhangi bir zenginleştirici madde içermeyen besiyerlerinde rahatlıkla üreyebilir. Buyyon besiyerinde 37°C'de, 8-12 saatte bulanıklık oluştururlar. Çoğu Enterobacteriaceae türü jeloz besiyerinde 18-24 saatte 2-3 mm çapında, ortası kabarık, düzgün kenarlı "S" tipi koloni oluşturur. Bazı türler birkaç pasajdan sonra kenarları ve yüzeyi düzensiz şekillerde olan "R" tipi koloni oluşturabilir. *Klebsiella* cinsindeki bakteriler ve diğer belirgin kapsül oluşturan türler "M" tipi koloni oluşturur. *Proteus* türleri ise çok hareketli oldukları için besiyeri yüzeyinde yayılarak ürerler ve koloni oluşumu göstermezler. Bu bakterilerin kolonilerinin gözlemlenebilmesi ve karışık ortamlardan saf kültürlerinin elde edilebilmesi için hareketlerinin engellenmesini sağlayan özel yöntemler kullanılmalıdır. *Serratia marcescens* ve *Serratia rubidaea* suşları, jeloz besiyerinde, oda sıcaklığında ürettikleri prodigiosin pigmenti sayesinde kırmızı renkli koloniler oluşturur. *Escherichia hermanni, Escherichia vulneris, Enterobacter sakazakii* ve *Pantoea agglomerans* kökenleri ile *Leclercia* cinsine ait bakteriler sarı renkli koloniler oluşturur. Ailedeki diğer bakterilerin kolonileri renksizdir. Türlerin çoğu eritrositleri parçalayan hemolizin salgılar (1,3,4,7).

2.1.4.Biyokimyasal Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin biyokimyasal özellikleri sınıflandırmada olduğu kadar rutin bakteriyolojik tanıda da önemlidir. Bu ailedeki bakteriler metabolik olarak çok aktiftir. Tümü glikozu fermente eder, bazıları gaz oluşturur. Aminoasitleri dekarboksilasyon yolu ile parçalarlar. Katalaz reaksiyonları

pozitif, *Plesiomonas spp*. dışında oksidaz testleri negatiftir. Nitratları nitritlere indirgerler (1,7,8).

2.1.5.Antijen Yapıları

Tüm Enterobacteriaceae türlerinde ortak olarak "Enterobacterial Common Antigen" (ECA) bulunur. ECA; hücre duvarında yer alan lipopolisakkarid tabakanın derin kısımlarında bulunan ortak bir antijendir. Ailenin en önemli ayırt edici özelliklerinden biridir.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin tümü, ECA'nin dışında karmaşık ve güçlü bir antijenik yapıya sahiptir. Bakterilerin temel antijenik yapılarına baktığımızda;

- Hücrenin dış duvarında yer alan somatik antijen (O antijeni),
- Kirpikli olan türlerde kirpik antijeni (H antijeni),
- Bazı bakterilerde bakteri duvarını çevreleyen bir katman şeklinde, bazı bakterilerde ise bir yüzey maddesi şeklinde az miktarda bulunan kapsül antijeni (K antijeni)

olmak üzere 3 temel antijen karşımıza çıkmaktadır (1,4,8).

2.1.6.Virulans Faktörleri

Enterobacteriaceae ailesinde yer alan türler patojeniteleri açısından çok geniş bir yelpaze oluştururlar. Bazı türler çok nadir olarak hastalık oluşturur ya da insanda enfeksiyon etkeni olarak bilinmeyen türlerdir. Bazıları ise çok yüksek morbidite ve mortaliteye sahip fırsatçı enfeksiyon etkeni türlerdir. Patojenitelerindeki bu farklılık bakterilerin değişik virulans faktörlerine sahip olmaları ya da bu faktörlerin bulunmamasıyla açıklanmaktadır (5).

Endotoksin: Hücre duvarının en dışında bulunan lipopolisakkarid (LPS) tabakasının "lipid A" bölümü, endotoksin özelliğindedir. Endotoksinler bakteri hücresinden dışarı salınmazlar, ancak bakteri ölümüyle ya da hücre duvarının yıkımıyla açığa çıkarlar. Isıya ve proteolitik enzimlere dayanıklı, asit hidrolizine duyarlıdır. Bütün bakterilerin endotoksinlerinin fizyolojik etkileri benzer özelliktedir.

Ekzotoksin: Hücre dışına salınan ve özgül fizyolojik etkilere sahip, toksik etkileri oldukça güçlü olan protein yapısındaki moleküllerdir. ETEC'in ısıya duyarlı toksini (LT) ve ısıya dayanıklı toksini (ST), EHEC'in salgıladığı verotoksin1 ve verotoksin2, S. dysenteriae'nin salgıladığı shiga toksin adı verilen ekzotoksinler; Enterobacteriaceae ailesindeki en önemli ekzotoksinlerdir (2-5).

Adhezinler: Mikroorganizmanın hedef hücreye tutunmasını adhezinler sağlar. Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerde fimbria ve dış membran proteinleri önemli adhezinlerdir.

Kapsül: Birçok Enterobacteriaceae üyesinde bulunur. Fagositozu önleyerek bakteriyi serumun bakterisidal etkisinden korur. *K.pneumoniae*'nin üriner sistem epiteline kolonizasyonunu sağlar. Yenidoğan sepsis ve menenjtine sebep olan *E.coli* K1 serotipinin kapsülü; bakterinin kan – beyin bariyerini geçmesinde yardımcı bir faktördür (1-3,5).

Bakteriyosinler: Birçok Gram negatif bakteri tarafından üretilen, benzer bir tür içindeki bakterilere karşı bakterisidal özellik gösteren maddelerdir. Bakteriyosinler bakteriye özel yapıdadır ve plazmid kontrolünde üretilir. *E.coli* tarafından üretilen bakteriyosine kolisin, *Klebsiella spp*. tarafından üretilene klebsin, *S.marcescens* tarafından üretilene de marcescin adı verilir (9).

2.1.7.Enterobacteriaceae İnfeksiyonları

Günümüzde; Enterobacteriaceae ailesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında enfeksiyon etkeni olarak izole edilen tüm mikroorganizmaların %50'sini, klinik olarak önemli Gram negatif çomakların %80'ini oluşturmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarının %70'inden, septisemi olgularının %50'sinden ve barsak enfeksiyonlarının önemli bir kısmından sorumludur. Enterobacteriaceae ailesinde bulunan ve tıbbi önemi olan başlıca patojenler: *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Proteus, Serratia, Providencia, Morganella, Hafnia, Edwardsiella, Yersinia, Shigella* ve *Salmonella*'dır (1,4,5).

2.1.8.Enterobacteriaceae İnfeksiyonlarında Bakteriyolojik Tanı

Enterobacteriaceae üyelerinin büyük çoğunluğu Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan genel üretim besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilir. Enterobacteriaceae enfeksiyonu şüphesiyle gönderilen bir örneğin kültürü için kanlı agara ekim yapılması yeterlidir. Bunun yanında MacConkey agar ya da EMB agar gibi bir seçici ayırıcı besiyerine ekim yapılması sonraki aşamada bakteri tanımlaması için kolaylık sağlayacaktır (1,4).

Farklı karbonhidratlar fermente etme, glikozdan gaz oluşturma, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, ONPG deneyleri, lipaz, üreaz, fenilalanin deaminaz, arginin, lizin, ornitin dekarboksilaz aktiviteleri, hareket, jelatini eritme, KCN'lü ortamda üreme gibi özellikleri bu bakterilerin tanımlanmalarında sıklıkla kullanılan deneylerdir (7,8).

2.1.9.Antibiyotik Duyarlılık Tespiti

Enterobacteriaceae ailesine ait bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlılığının saptanmasında; kolay uygulanabilen, düşük maliyetli ve doğru sonuç veren disk difüzyon testi kullanılmaktadır.

Birçok Enterobacteriaceae üyesinde belirli antibiyotiklere karşı doğal direnç vardır. Bu bakteriler klinik kullanımda olan penisilin G, makrolidler, klindamisin, fusidik asit, linezolid, glikopeptidler ve streptograminler gibi antimikrobiyallerin etki spektrumları içerisinde yer almaz.

Enterobacteriaceae ailesinden bakterilerde antibiyotik direnci; intrinsik ve kazanılmış olmak üzere iki tip direnç mekanizması ile oluşmaktadır. İntrinsik tipte direnç; antibiyotik kullanımı ile ilişkisi olmayan, bakteride doğal olarak bulunan kromozomal dirençtir. Klinik bir örnekten izole edilen bakterinin intrinsik dirençli olduğu bilinen ilaçlara karşı duyarlılık testleri yapılmamalı ve raporda bildirilmemelidir. Birçok türde ampisiline, sefazoline ve polimiksinlere doğal direnç olduğu bilinmektedir (3,10).

Kazanılmış direnç ise antibiyotik kullanımının selektif baskısı sonucu suşların çoğunda görülen dirençtir. Bu bakterilerde antimikrobiyallere direnç özelliği,

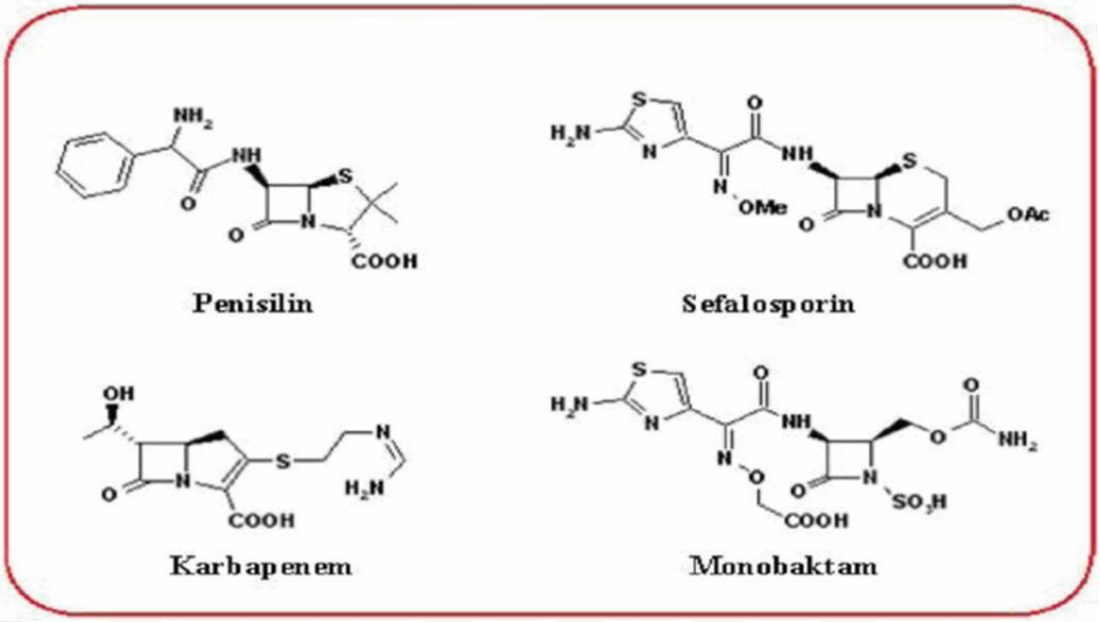
genellikle plazmidler aracılığı ile diğer bakterilere aktarılabilmekte ve direnç yayılabilmektedir.

Kromozomal yerleşimli direnç genleri de transpozonlar aracılığıyla bakteriler arasında aktarılabilir. Bakteriden bakteriye direnç genlerinin geçişine aracılık eden bu mekanizmalar Enterobacteriaceae ailesinde çok yaygındır. Buna bağlı olarak da antimikrobiyal direnç kolayca yayılabilmektedir. Direnç oranları coğrafik bölgelere ve türlere göre farklılık göstermektedir. Özellikle antimikrobiyallerin çok yoğun olarak kullanıldığı hastane ortamlarında dirençli bakterilerin seleksiyonu sonucu hastane enfeksiyonlarında sıklıkla rastlanan bakteriler olan Enterobacteriaceae üyelerinde antimikrobiyal direnç boyutu giderek büyüyen bir sorun haline gelmiştir (3-5,10,12).

2.2.Beta-laktam antibiyotikler

Enterobacteriaceae ailesinde bulunan bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde beta laktam grubu antibiyotiklerin önemli bir yeri vardır (13).

Beta-laktam grubu antibiyotikler etkilerini peptidoglikan sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak gösterir (14). Beta-laktam antibiyotikler yaygın olarak kullanılan bakterisid etkili ve toksisiteleri düşük olan ilaçlardır. Bu gruptaki antibiyotiklerin ortak özellikleri yapılarında beta-laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır (15) (Şekil 1). Her grup beta laktam antibiyotiğin özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Monobaktamlarda beta-laktam halkasına bağlanan başka halka bulunmamaktadır. Beta-laktam antibiyotikler 5 grupta toplanabilir (16).



Şekil 1: Beta laktam grubu antibiyotiklerin halka yapıları

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktamlar
4. Karbapenemler
5. Betalaktamaz inhibitörlü (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam) beta-laktamlar

2.2.1.Penisilinler

Penisilinlerin temel yapısı, bir tiazolidin halkası, bir betalaktam halkası ve bir yan zincirden oluşmaktadır. Beta-laktam ve tiazolidin halkasının oluşturduğu yapı 6aminopenisilanik asit (APA) adını alır ve esasen tüm penisilinler 6-APA türevidir. Antibakteriyel etkiyi beta-laktam halkası sağlar. Hücre duvarındaki peptid zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturan transpeptidazlar, karboksipeptidazlar, endopeptidazlar olan penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak bakteri hücre duvar yapımının transpeptidasyon basamağını inhibe edip peptidoglikan çatının yapımını önlerler. Penisilin grubu antibiyotikler, antimikrobiyal aktivitelerine göre 5 grupta sınıflandırılabilir (16).

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

b) Aminopenisilinler: Ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, siklasilin, episilin, pivampisilin,

c) Penisilinaza dayanıklı penisilinler: Metisilin, nafsilin, izaksazolil penisilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, oksasilin,

d) Üreidopenisilinler:Karbenisilin, indanil karbenisilin (korindasilin), tikarsilin,

e) Geniş spektrumlu pseudomonaslara etkili penisilinler: Azlosilin, mezlosilin, piperasilin.

2.2.2.Sefalosporinler

Penisilinlerden beş üyeli tiazolidon halkası yerine, altı üyeli dihidrotiazin halkası'nın (sefem çekirdeği) olmasıyla ayrılır. Bu halka sefalosporinlerin beta-laktamazlara karşı daha stabil olmasını sağlar. PBP'lere bağlanarak hücre duvar sentezini önler ve bakterisidal aktivite gösterir. Sefalosporinlere direnç beta-laktamaz yapımı, bakteri hücre duvar geçirgenliğinin azalması PBP'lerde modifikasyon olmak üzere başlıca 3 mekanizmayla gelişir. Sefalosporin direncine en sık yol açan mekanizma betalaktamaz yapımıdır. Sefalosporinlerin beta-laktamazlara karşı stabilitesi farklılık gösterir. Sefalosporinler Gram negatif bakteri hücre duvarından protein yapısında porin adı verilen su dolu kanalları kullanarak geçer. Porinlerin sayısında veya çapında olan değişiklikler bakteriyel direnç ile sonuçlanır.

2.2.3.Monobaktamlar

Monosiklik beta-laktam halkasından oluşur. Monobaktamlar içerisinde tek klinik kullanımı olan antibiyotik *Chromobacterium violaceum*'dan üretilen aztreonamdır. Aztreonam, sentetik ve yalnızca parenteral kullanılan, yalnızca Gram-negatif bakteriler üzerine etkisi olan bakterisid etkili monobaktam bir antibiyotiktir.

Gram negatif bakterilerin hücre zarından geçer ve PBP'lere bağlanarak etkisini gösterir. Plazmid ve kromozomal beta laktamazların çoğuna ve sınıf B enzimlerinin hidrolizine karşı dirençlidir. Üçüncü kuşak sefalosporinleri inaktive eden sınıf C beta laktamazlar tarafından inaktive edilir.

2.2.4.Karbapenemler

En geniş spektruma sahip beta-laktam grubu antibiyotikler olup, tıbbi kullanıma girmeleri 1970'li yılların ortalarında tienamisinin bulunmasıyla başlamıştır. Karbapenemler diğer beta-laktamlar gibi hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. PBP'ler ile kovalan bağlanarak yaparlar. Karbapenemler başta PBP 2 olmak üzere, PBP 1A, PBP 1B, PBP 3, PBP 4 PBP 5'e de daha az olmak üzere bağlanır. Geniş etki spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu betalaktamaz enzimlerine karşı dirençli olmaları ve indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantlarının seçimine meydan vermemeleri önemli avantajlarıdır.

2.2.5.Beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktamlar

Beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmiş beta-laktam antibiyotiklerdir. Bunlar pratik olarak klavulanik asit ile kombine edilmiş amoksisilin ve tikarsilin, sulbaktam ile kombine edilmiş ampisilin ve sefoperazon, tazobaktam ile kombine edilmiş piperasilindir (ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat, tikarsilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam). Sık rastlanan toplum kökenli enfeksiyonlarda beta laktamazlardan dolayı artan direncin aşılmasında tercih edilen bileşiklerdir.

2.3.Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları

Beta-laktam grubu antibiyotikler, etkilerini hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazları [penisilin bağlayan proteinler (PBP)] inhibe edip hücre duvar sentezini durdurarak gösterir (14,17). Bir beta laktam antibiyotiğin etki gösterebilmesi için, eğer varsa dış zardan ve periplazmik aralıktan geçmesi, hücre zarındaki PBP'lere etkin konsantrasyonda ulaşması ve bu enzimlere bağlanması gereklidir. Beta-laktamlara direnç gelişimine neden olan genel mekanizmalar, ilacın beta-laktamazlarca parçalanması, hedef PBP değişimleri ile ilacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasını engelleyen porin değişikliklerine bağlı geçirgenlik azalması ve/veya aktif pompa (efluks) sistemleridir. Bunlardan ilki ve sonuncusu Gram negatif bakterilerde daha sık görülmektedir. Dirençli bakteriler bu basamakların her birinde beta-laktam ilaçlar için bir engel oluşturabilirler. Örneğin, Gram negatif bakteriler porin kanallarını kapatarak geçişi zorlaştırabilir ve/veya periplazmik aralıktaki betalaktamazlar beta-laktam antibiyotiği parçalayabilir, bazı bakteriler beta-laktamların iyi bağlanamadığı yeni veya değişmiş PBP'ler eksprese edebilir (14). Bu mekanizmaları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

2.3.1. İlacın Hedefine Etkin Konsantrasyonda Ulaşmasının Engellenmesi

Bu durum, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan veya hedefine ulaşamadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilir.

2.3.1.a. Dış membran porin değişimleri

Küçük hidrofilik moleküller Gram negatif bakterilerin dış zarından ancak içi su dolu kanalcıklar olan porinler aracılığı ile geçebilir (16). Bu nedenle, porin proteinlerinin yapısında veya iyonik yükte meydana gelebilecek değişiklikler veya özel porinlerin kaybı, hidrofilik moleküllerin girişini engellemektedir. Antibiyotiklerin porinlerden geçişi; şekli, büyüklüğü, yükü ve hidrofilik özelliklerine bağlı olarak belirlenir. Dış membranın özel bir beta-laktama karşı geçirgenliğinin az olması o mikroorganizmanın doğal bir özelliğidir ancak geçirgenliğin antimikrobiyal tedavi sırasında azalması sonradan porin proteinlerinde bir değişim meydana geldiğini gösterir. Beta-laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler

içerdikleri için porin proteinlerdeki değişimlerden etkilenmektedir (14,18). Dirençli suşlarda genellikle porin kaybının yanısıra aktif pompa sistemleri veya beta-laktamazın aşırı üretimi gibi 2. bir mekanizma daha yer alır. Hem aktif pompa sistemleri hem de beta-laktamazlar dış membrandan az ve yavaş geçen substratları üzerinde daha kolay etki göstererek direnç düzeylerini arttırırlar. Örneğin, sefoksitine dirençli *E.coli* suşlarının çoğunda, bu direncin OmpF kaybı ile AmpC tipi enzimlerin aşırı üretiminin sinerjik etkilerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (19,20). *K.pneumoniae* suşlarında da, moleküler sınıf A beta-laktamazların varlığı, bir dış membran porini olan OmpK35'in kaybı ile birlikte gitmektedir.

2.3.1.b. Aktif pompa (efluks) sistemleri:

Antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinin beta-laktamların da aralarında bulunduğu birçok antibiyotik sınıfına karşı doğal veya kazanılmış dirençte önemli olduğu anlaşılmıştır. Hatta Gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere doğal direncindeki temel rolü eskiden sanıldığı gibi dış membranın değil, aktif pompa sistemlerinin oynadığı belirlenmiştir (14,21). Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direnç gelişimine neden olur. Örneğin, *P.aeruginosa* suşlarında, bir beta-laktam ile tedavi sırasında, MexABOprM ve/veya diğer 3 elemanlı pompa sistemlerini kontrol eden regülatör genlerdeki mutasyon ve pompa sistemlerinin aktivasyonu sonucunda, bu suşlar sadece betalaktamlara değil aynı zamanda kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklinler, trimetoprime de dirençli hale gelmektedir (21).

2.3.2.Penisilin Bağlayan Protein Değişimleri

PBP'ler yapısal olarak beta-laktamazlara çok benzeyen D, D-transpeptidazlar ve D,D-karboksipeptidazlardır. Hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta-laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizmadır. Aktif bölgelerinde bir serin aminoasiti bulunduğu için serin proteazlar arasında yer alırlar. PBP'ler moleküler ağırlıklarına göre 1-4 arası sayılar ile adlandırılırlar. Aynı molekül ağırlığında birden fazla PBP varsa o zaman sayıların yanına harfler eklenir (PBP 1a gibi). Değişik PBP'lerin farklı beta-laktamlara

bağlanma afiniteleri ve etkilendikleri ilaç düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum antibiyotiklerin etkinliklerinin birbirinden faklı olmasının nedenlerindendir. Enzimin aktif bölgesi periplazmik kısımda yer almaktadır. Beta-laktam ajanlar PBP'lerin substrat analoglarıdır. N-asetil muramik asit pentapeptid ünitesinin son kısmında yer alan "D-alanil-D-alanin" dipeptidine benzerler. Bu nedenle, PBP'ler aynen betalaktamazlar gibi beta-laktamlara bağlanır ve çok yavaş bir şekilde hidrolize ederler ve olay geri dönüşümsüz bir açil-enzim kompleksi oluşması, ilacın açil türevinden ayrılamayan enzimin duvar sentezindeki görevini yapamaması, hücre duvar sentezinin durması ve yapım-yıkım dengesinin yıkım yönünde bozulması ile sonlanır. Beta-laktam antibiyotikler eş zamanlı olarak birden fazla PBP'yi inaktive ederek etki gösterirler. Özellikle yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin inhibisyonu bakteri için ölümcüldür (14).

2.3.3. Beta-Laktamaz Üretimi

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağını, parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Beta-laktamaz yapımı başta Enterobacteriaceae üyeleri olmak üzere Gram-negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en önemli mekanizmadır. Bu enzimlerin genetik temeli kromozomlar, plazmidler veya transpozonlardır. Bu enzimler Gram-negatiflerde periplazmik aralıkta bulundukları için beta-laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar rol almaktadır. Bugün bilinen 600 civarında klinik olarak farklı önemi olan, beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. Beta-laktamazların isimlendirilmesinde birden fazla yöntem ve/veya faktör kullanılmaktadır. Bazı enzimler, hedef substratlarına göre (CARB, FUR, IMP, OXA), bazıları biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), bazıları içerdikleri genlere (Amp, CepA), bazıları izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bazıları ise keşfeden kişilere göre (HMS) isimlendirilmiştir (25,26,27). Ancak, bu isimlendirmelerden bazıları, günümüzde geçerliliklerini yitirmişlerdir. Örneğin; SHV, sülfidril variabl'dan kısaltılmış bir isime sahipken, günümüzde SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu açığa çıkmıştır. Benzer şekilde, ilk kez

Pseudomonas'tan izole edilmiş olan PSE enziminin, artık enterobakterilerde de bulunduğu bilinmektedir.

2.4.Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Beta-laktamaz enzimlerinin bazı özelliklerine göre çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma disiplinleri, Ambler ve Bush-Jacoby Mederios sınıflandırmalarıdır (28). Bush beta laktamazları biyokimyasal (substrat profili) özelliklerine; Ambler, aminoasit ve nükleotit dizilerine (Moleküler Sınıflama); Sykes ve Richmond, izoelektrik noktalarına göre sınıflandırmışlardır. Günümüzde A, B, C ve D olmak üzere 4 çeşit beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır (14, 22-24) (Tablo 1).

A Sınıfı: Plazmid kontrolünde olan penisilinaz: Aktif bölgesinde serin aminoasiti taşırlar. Öncelikli olarak penisilinleri hidrolize ederler.

B Sınıfı: Aktivasyon için çinko veya bakır gibi divalan katyonlara gereksinim duyan metallo enzimlerdir. Klasik inhibitörlere dirençli olan bu enzimler, EDTA ve merkapto bileşikleri gibi metal şelatörleri ile inhibe olurlar. Karbapenemler başta olmak üzere hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotiği hidrolize edebilme potansiyelleri vardır. Ülkemizde henüz çok az sayıda tanınmasına rağmen, izole edilen suşların hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (29).

C Sınıfı: Kromozom kontrolünde olup sefalosporinaz aktiviteleri olan beta laktamazlardır (22,24).

D Sınıfı: Oksasilini hidrolize eden enzimlerdir.

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

Bush ve arkadaşları, ß-laktamazları substrat profilleri ve ß-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temeline göre 4 grupta toplamışlardır. Ancak bu grupların içerisinde bazı alt gruplar da yer almaktadır (28) (Tablo 1).

Tablo 1: Beta Laktamazların Fonksiyonel ve Moleküler Sınıflandırması (11)

Fonksiyonel Sınıf	Moleküler Sınıf	Substrat	Klavulonik asit tarafından inhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Yok	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri
2a	A	Penisilinler	Var	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	Var	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Var	GSBL'ler
2br	A	Penisilinler	±	İnhibitörlere dirençli TEM β-laktamazları (IRT)
2c	A	Penisilinler, karbapenisilin	Var	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	±	OXA-1, OXA-11, PSE-2
2e	A	Sefalasporinler	Var	*P. vulgaris*'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	Var	*E. cloacae*'nin NMC-A'sı
3	B	Karbapenemler dahil birçok β-laktam	Yok	*S. maltophilia*'nın L1'i, *B. fragilis*'in CerA'sı
4	A	Penisilinler	Yok	*Burkholderia cepacia* penisilinazı

2.5.GSBL'lerin Tarihçesi

Beta-laktamazların tarihçesi, 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından bir *E.coli* suşunda bu antibiyotiği parçalayabilen bir penisilinazın gösterilmesi ile

başlamaktadır. 1944 yılında Kirby, S.aureus suşlarından benzer nitelikte bir enzim elde etmiştir. Penisilinin klinik tedaviye girmesini izleyen 20-25 yıl boyunca betalaktamazların sayı ve çeşitleri oldukça kısıtlı kalmıştır. Bu dönemde Gram-negatif bakterilerin çoğunun TEM-1, *K.pneumoniae* suşlarının SHV-1 ürettiği görülmektedir. Ancak, 1978-1980 yıllarında, yeni beta-laktam antibiyotiklerin (sefamisinler, karbapenemler, sulfonlar, monobaktamlar) kullanılmaya başlamasıyla beta-laktamaz tiplerinin de hızla arttığı görülmektedir. Beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı, beta-laktamazların evrimsel değişikliklere uğramasına, sayı ve etki spektrumlarının çok ciddi boyutta artmasına neden olmuştur. 1995-2000 yılları arasında grup 1, 2be, 2br, 2d ve 3'deki enzim sayıları neredeyse 2 katına çıkmıştır. Penisilin G'yi hidrolizleyen, beta-laktamaz (penisilinaz) üretimiydi ve plazmidle yayılmaktaydı. Gram negatiflere de etkili olan ampisilin gibi yarı sentetik penisilinler 1960'lı yıllarda, ardından da 1. kuşak sefalosporinler gündeme gelmiştir. Gram negatif bakterilerde 1963'lerin başlarından itibaren geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu plazmidik enzimler yoluyla temosilin dışında tüm penisilinler ve 1. kuşak sefalosporinler inaktive edilmiştir. Bununla birlikte, 1970 lerin sonunda ve 1980'li yılların başında önce sefamisinler ve 2. kuşak sefalosporinler bulunmuştur. Ardından, Gram negatiflere karşı daha etkili, 3. kuşak sefalosporinler kullanıma girmiştir. Geçen zamanla birlikte, gram negatif bakteriler beta-laktamazlarını modifiye etmiş, TEM-1, TEM-2, SHV-1 de bir veya birkaç aminoasidi değiştirerek bu enzimlerin etki spektrumlarını biraz daha genişletmiş ve genişlemiş etkili beta-laktamazları (GSBL) üretmeye başlamışlardır. En sonunda, ilk GSBL pozitif suş, *K.pneumoniae* olarak 1983'de Almanya'dan bildirilerek, literatürdeki yerini almıştır (14,30).

İlk zamanlar GSBL pozitif bakteriler, Gram negatiflere etkili tüm penisilinleri, 3. kuşak başta olmak üzere sefalosporinleri ve monobaktamları inaktive etmişlerdir. Son 20 yıldır özellikle Gram-negatif bakterilerde sefalosporinlere dirençte öne çıkan mekanizma olan ve klinikte önemli bir sorun haline gelen GSBL'ler, *Klebsiella spp*. ve *E.coli*'de daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella spp.* ve *Shigella flexneri* de dahil, birçok enterik bakteride bildirilmiştir. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *E.coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır (31). Bu enzimler bir iki aminoasit değişikliği ile dar spektrumlu beta laktamazlardan köken alırlar (32). Aktif bölgelerinde serin

bulunan, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksiiminosefalosporinleri hidroliz edebilen, klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan beta laktamazlardır. Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır. GSBL üreten bakteriler her zaman aminopenisilinlere (ampisilin veya amoksisilin), karboksipenisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin) ve üreidopenisilinlere (piperasilin, mezlosilin) dirençlidir. GSBL üreten mikroorganizmalar çoğu kez aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer gruptaki antibiyotiklere de dirençlidir.

Bugüne kadar 500-600 beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların 200-300 tanesi GSBL'lerdir (33). Tanımlanan ilk GSBL üreten suşun seftazidim ve sefotaksimi belirgin değerlerde hidrolize eden klasik SHV-1 beta-laktamazın bir mutant formu olduğu anlaşılmıştır. Bu sebeple bu enzime SHV-2 beta-laktamaz adı verilmiştir. Daha sonra bunu TEM-2 beta-laktamazdan genetik olarak sadece iki aminoasit farklı olan Fransa'dan bir mutant enzim bildirisi takip etmiştir (21).

Bulunuşundan günümüze kadar GSBL'lerin sayısında ve çeşidinde hızlı bir artış dikkati çekmiştir. Bu enzimler enterik çomaklarda sınırlı kalmayarak *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi nonfermentatif etkenlere de hızla yayılmakta olup İngiltere, İspanya, Portekiz, İtalya Yunanistan, ABD, Kuzey Afrika, Güney Amerika, Japonya ve Çin başta olmak üzere hemen hemen tüm uzak doğu ülkelerinde tespit edilmiştir. TEM ve SHV tip beta-laktamazların mutant formu olan GSBL'ler, orijinal enzimlerin aksine geniş spektrumlu sefalosporinleri, aztreonamı ve diğer tüm penisilinleri hidrolize ederler. Ancak sefamisinler bu kuralın dışında kalır (33-35). SHV-2 ve SHV-5 Almanya'da, SHV-3, SHV-4 ve TEM-3 Fransa'da, ve SHV-5 ise Yunanistan'da daha yaygın enzimlerdir. Önceleri TEM ve SHV tüm dünyada yaygın iken, günümüzde CTX-M tipi daha yaygın hale gelmiştir (31,33).

2.6.GSBL Tipleri

GSBL'lerin çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almışlardır. Günümüzde TEM türü beta laktamazların sayısı 130'u, SHV türü betalaktamazlarınki 50'yi geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda

bunlardan köken almayan (CTX-M, PER, VEB vs.) genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olmuştur (36-38).

2.6.1.TEM'den Köken Alan GSBL'ler

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi 1987 yılında bildirilen TEM- 3 ‘tür (39). GSBL fenotipi TEM enziminde, belirli pozisyonlarda oluşan aminoasit değişiklikleri ile meydana gelmektedir. TEM grubu beta-laktamazlar *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Proteus rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi Enterobacteriaceae üyelerinde sık bulunmaktadır (30). Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1, Gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *E.coli*’lerin %90’ında dirençten sorumludur. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup, ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere karşı dirence neden olur. Ancak oksiimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. Bazı amoksisilin-klavulanik asite dirençli *E.coli*'lerin nükleotid dizilerinin incelenmesi ile TEM beta-laktamazlarındaki mutasyonlar sonucu, 1997 yılından itibaren beta laktamaz inhibitörlerine dirençli yeni varyantların oluştuğu belirlenmiştir. Bu enzimler IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra köken aldıkları TEM ya da SHV’de sıralamaya girmiştir.

2.6.2.SHV'den Köken Alan GSBL'ler

SHV grubu enzimlerin köken aldığı SHV–1 enzimi en sık *K.pneumoniae* 'da bulunmaktadır ve sıklıkla kromozomal bir enzimdir. SHV kökenli GSBL’lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha azdır, ayrıca aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir (40). Bugüne kadar aminosit yer değiştirmelerinin benzersiz kombinasyonları baz alınarak 50’den fazla SHV tanımlanmıştır. SHV–1 aminositlerinin %68’i TEM-1 ile ortaktır. Avrupa ve Amerika’da SHV tip GSBL’lerin hakim olduğu bildirilmektedir. SHV–5 ve SHV–12

bu grubun içinde en yaygın görülenleridir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır, oksiiminosefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (30,41).

2.6.3.OXA'dan Köken Alan GSBL'ler

Oksasilini hidrolize edebilmelerinden dolayı bu ismi alırlar. OXA grubu enzimler genellikle P.aeruginosa'da bulunan GSBL'lerdir. Bu enzimleri taşıyan *Pseudomonas*'ların en önemli özelliği seftazidime yüksek direnç göstermeleridir. Fakat OXA-17 taşıyan suşlar seftazidimden daha fazla sefotaksim ve sefepime karşı direnç gösterir. OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir ve substrat oksasilin ve kloksasilindir. OXA-31 ise sefepime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (30,42). Aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiminosefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir. Birçok OXA tipi GSBL'ler klavulanik asit tarafından inhibisyona oldukça dirençlidir (35).

2.6.4.CTX-M tipi GSBL

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni katılan bir gruptur. Bu enzimler TEM ve ailelerine üye olmayan en yaygın gruptur. Sefotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmelerinden dolayı CTX-M olarak adlandırılmıştır. Bazıları ise, seftazidimi sefotaximden daha hızlı hidroliz ederler. Günümüzde 40'tan fazla CTX-M enzimi bilinmektedir. Sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri aminoasit değişiklikleri sonucu değil, büyük olasılıkla enzimin omega halkasındaki ve beta ucundaki yapısal değişiklikler sonucudur. Bu enzimlerin önemli diğer bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır. İlk CTX-M beta-laktamaz enzimi 1989 yılında Almanya'dan *E.coli*'de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere birçok Enterobacteriaceae türünde saptanmıştır (30, 40-43).

Günümüzde CTX-M ailesinde 40'tan fazla enzim bulunmaktadır ve bunlar aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre beş gruba ayrılmıştır. CTX-M–14, CTX-M–3 ve CTX-M–2 en yaygın olan enzimlerdir. Yayılmaları hem plazmidlere hem de

hareketli genetik elementlere (ISEcp1 gibi) bağlıdır. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae,* tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki enfeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir (44).

2.6.5.Diğer Sınıf A GSBL'ler

Diğer Sınıf A GSBL'ler yaygın değildir. Esas olarak *P.aeruginosa*'da ve nadir coğrafik bölgelerden rapor edilmiştir. Bunlardan PER-1 enzimi ülkemizde ilk kez S.Typhimurium daha sonra *P.aeruginosa* ve *A.baumanii* suşlarında gösterilmiştir. Plazmid kontrolünde bir enzim olan PER-l enzimi içeren *P.aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidime çok dirençli olmalarına karşın piperasilin için daha düşük bir direnç göstermeleridir. Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktama duyarlıdır.

2.6.6.İnhibitör Dirençli Geniş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç 1997 yılından itibaren bildirilmeye başlanmıştır. Nükleotid dizilerinin incelenmesi sonucu TEM beta-laktamazlarındaki mutasyonlar sonucu GSBL'lerde olduğu gibi yeni beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli varyantların (IRT BL) oluştuğu belirlenmiştir. TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT' ler 3. kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir. Bu enzimler önceleri IRT (inhibitör rezistan TEM) olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra köken aldıkları TEM yada SHV'de sıralamaya girmiştir. IRT'ler en sık olarak *E.coli*'de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae, Klebsiella oxytoca, P.mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir. İnhibitörlere dirençli TEM türevleri klavulanik asit ve sulbaktama ve bunların klinik kullanımda olan kombinasyonlarına dirençli, tazobaktam ve piperasilin-tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdır (30).

2.7.GSBL Sentezleyen Bakterilerin Klinikte Neden Olduğu Sorunlar

2.7.1.Direnç

Bu enzimleri taşıyan plazmidler aynı zamanda pek çok beta-laktam dışı antibiyotiğe karşı genetik materyal taşıdığından GSBL üreten bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol direnci de eş zamanlı bulunabilmektedir.

2.7.2.Hastaların Kolonizasyonu

GSBL sentezleyen bakterilerilerle kolonizasyon riskini artıran faktörler, uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süreli yoğun bakımda kalma, huzur evinde kalıyor olma, altta yatan ciddi ve ağır hastalık varlığı, hastanede geniş spektrumlu sefalosporinlerin yaygın kullanımı, invaziv işlemler, düşük doğum ağırlığı olarak sayılabilir.

2.7.3.İnfeksiyonların Tedavisinde Zorluk

Bu bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda çoklu direnç gelişimi sık görüldüğünden tedavi seçenekleri çok kısıtlanmaktadır.

2.7.4.Morbidite ve Mortalite

Pek çok retrospektif çalışmada GSBL varlığının mortalite ve morbiditeyi olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

2.7.5.Laboratuvarda GSBL Saptanmasında Karşılaşılan Zorluklar

GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere affinitesinin değişik olması ve inokülum etkisi gibi nedenlerle 3.kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görünebilir. Örneğin TEM-26 taşıyan *K.pneumoniae* suşu in vitro seftazidime dirençli, sefotaksime duyarlı gibi görünebilir. TEM-26 düşük yoğunluklarda bile seftazidime yüksek afinite gösterir. Buna karşın sefotaksime hidrolitik aktivite enfeksiyon ortamında olduğu üzere bakteri yoğunluğunun arttığı durumda ortaya çıkar. Bu nedenle sefotaksimle tedavi başarısızlıkla sonuçlanır. Seftazidime yüksek afinite gösteren GSBL'lerin sık rastlandığı bir yerde laboratuarın rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 3.kuşak

sefalosporin olarak sefotaksim ve seftriaksonu tercih etmesi GSBL saptanmasını güçleştirecektir.

2.8.GSBL'lerin Laboratuvar Tanısı

Üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı direncin seviyesi farklı GSBL enzimleri arasında çok fazla değişkenlik göstermektedir. GSBL'yi araştırmanın en iyi yolu, başlangıçta sefpodoksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim veya aztreonama azalmış hassasiyetin araştırılması ve sonunda indikatör bir sefalosporinle bir betalaktamaz inhibitörünün (genellikle klavulanik asit) arasındaki sinerjinin gösterildiği fenotipik doğrulama testinin yapılmasıdır (24).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten kökenler için tanımlanan "GSBL üreten kökenler tüm penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençlidir" kuralı, 2010 yılında CLSI tarafından sefalosporin sınır değerlerininin değiştirilmesi ve gerçekleştirilen farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar sayesinde terk edilmiştir. EUCAST da aynı görüşte hareket etmiştir. GSBL üreten kökenlerin uzun bir süre sefalosporinlere dirençli bildirilmelerinin aşırı karbapenem ve florokinolon tüketimine, dolayısıyla artan karbapenem direncine yol açtığı belirtilmektedir. Sefalosporinlere benzer şekilde karbapenemler için de sınır değerleri, CLSI tarafından 2010 yılında aşağı çekilmiş, bu sayede karbapenemaz üreten kökenler de dâhil olmak üzere, duyarlılık sonuçlarında herhangi bir değişiklik yapmadan bildirmek mümkün olmuştur.

2.8.1.Tarama testleri

GSBL varlığının saptanmasında test edilecek bakteri 0.5 McFarland standardına göre hazırlanır. Bakteri süspansiyonu pamuklu bir silgiç yardımıyla Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine Kirby-Bauer yöntemine göre yayılır ve CLSI için sefpodoksim (10 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg) ve/veya aztreonam (30 µg) diskleri; EUCAST için sefpodoksim (10 µg), seftazidim (10 µg), sefotaksim (5 µg) ve/veya seftriakson (30 µg) diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra antibiyotik zon çapları ölçülür (Tablo 2).

Tablo 2: CLSI/EUCAST Tarama Kriterleri*

	CLSI			EUCAST		
	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon	Disk Difüzyon		Sıvı veya agar dilüsyon
Antibiyotik	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	MİK
Sefpodoksim	10 µg	≤17	4 µg/ml	10 µg	<21	>1 µg/ml
Seftazidim	30 µg	≤22	1 µg/ml	10 µg	<22	>1 µg/ml
Aztreonam	30 µg	≤27	1 µg/ml	-	-	-
Sefotaksim	30 µg	≤27	1 µg/ml	5 µg	<21	>1 µg/ml
Seftriakson	30 µg	≤25	1 µg/ml	30 µg	<23	-

**71 no'lu kaynaktan alınmıştır.*

2.8.2.Fenotipik doğrulama testleri

Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler şunlardır:

1. Kombine disk yöntemi

2. Çift disk sinerji yöntemi

3. E test yöntemi

4. Mikrodilüsyon yöntemi

5. Üç boyutlu test

2.8.2.1.Kombine disk yöntemi

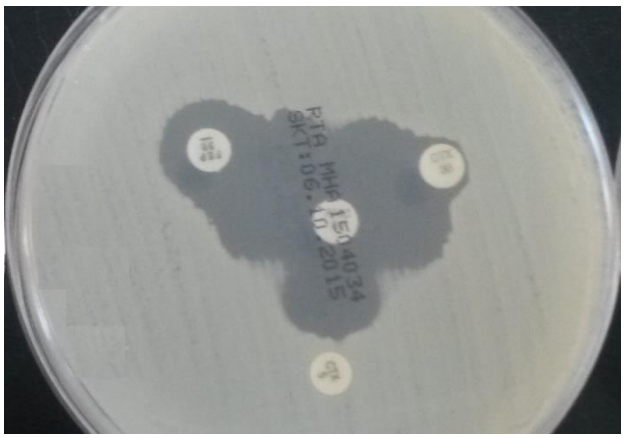
McFarland 0.5 standart yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton besiyerine klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra, disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (14) (Şekil 2).



Şekil 2: Kombinasyon disk yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü

2.8.2.2.Çift disk sinerji yöntemi

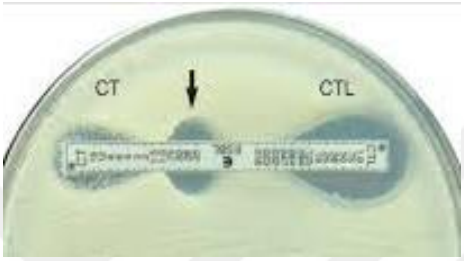
Jarlier ve arkadaşları (45) tarafından geliştirilen ve GSBL'nin belirlenmesinde en yaygın kullanılan testlerden biridir. McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Muller-Hinton besiyerine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 20 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) veya sefpodoksim (POD) diskleri yerleştirilir. On sekiz saat 35°C'de inkübasyondan sonra test edilen sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (14) (Şekil 3).



Şekil 3: Çift disk sinerji yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü

2.8.2.3.Gradient şerit yöntemi

"E-test ESBL" stripleri (AB Biodisk, İsveç), bir ucunda sefotaksim (CTX), diğer ucunda sefotaksim ve klavulanik asit (CTX-CLA) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir (Şekil 4). CTX ve CTX-CLA MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde seftazidim ve seftazidim-klavulanik asit içeren E-test stripleri de bulunmaktadır.



Şekil 4: Gradient şerit yönteminde GSBL pozitifliğinin görünümü

2.8.2.4.Mikrodilüsyon yöntemi

Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde ≥8 kat azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (14).

2.8.2.5.Üç boyutlu test

Bakterilerin kanlı agar besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonları Triptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek 35ºC'de dört saat inkübe edilir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözdürülerek enzim ekstraksiyonu yapılır. Standart disk difüzyon testi için Mueller Hinton agara ATCC 25922 *E.coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılır ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µL elde edilen enzimlerden konulur. Petriler 35 ºC'lik etüvde bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen

yarıklardaki suşlardan 3 mm'ye eşit ve 3 mm'den fazla distorsiyona neden olanlar "üç boyutlu test pozitif" olarak kabul edilir (46).

2.8.3.Otomatize sistemler

Bakteriyolojide kullanılan VITEK 2 (Biomerieux, Marcy I'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test gibi otomatize sistemler de GSBL üreten suşları saptayabilmektedirler. Bu sistemler; GSBL varlığını saptadığında çeşitli kuralları işleterek tüm penisilinleri, sefalosporinleri ve aztreonamı dirençli olarak rapor ederler. Bu sistemlerin özellikle karbapenem dirençli K. pneumoniae suşlarındaki direnci saptamakta yetersiz olduğu bildirilmektedir (47).

2.8.4.Hızlı tanı yöntemleri

GSBL üreten bakteriler için HMRZ-86 kromojenik substratının kullanıldığı bazı yöntemler bildirilmiştir. Bu kromojenik substratın kan kültürlerine eklenmesi ile GSBL üreten bakterilerin (sıvı besiyerine pasaj yapıldığında) 15 dakika-2 saat içinde saptanması mümkün olmaktadır (48). Bu substratın kullanıldığı Cica Beta Test (Kanto Chem, Japonya; Mast İngiltere) ile 2-15 dakikada GSBL, AmpC ve metallobetalaktamaz üretimi saptanabilmektedir. Yine sefpodoksim içerdiği için GSBL üreten bakterileri seçmenin yanı sıra *E.coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* ve *Proteae* grubu bakterilerin ayırımını yapabilen ChromID ESBL (Biomerieux, Marcy I'Etoile/Fransa) hızlı tanı sağlayan ticari kromojenik bir besiyeridir (49). Bir başka kromojenik besiyeri olan CHROMAgar CTX'in ise, AmpC üreten izolatlarda bile CTX-M pozitif Enterobacteriaceae üyelerini saptayabildiği bildirilmiştir (50).

2.8.5.Moleküler tanı yöntemleri

GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın belirlenmesi var olan GSBL'leri göstermek için yeterli olmaktaydı. İzoelektrik odaklama yöntemi ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenerek hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (51). Ancak sayıları 150'nin üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan enzim tiplerinin sadece izoelektrik noktalara dayanarak belirlenmesi artık mümkün görünmemektedir. Günümüzde özgül enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. En sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntem betalaktamaz genlerine spesifik oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı PZR'dir. Bu yöntemle ancak enzimin bağlı olduğu aile saptanabilir, enzim varyantları arasında ayırım yapılamaz. Bu amaçla geliştirilen oligotyping yöntemi ile TEM-1, TEM-2 ayrımı yapılabilir (52). Oligotyping metodunda nokta mutasyonları saptayabilen problar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sekans spesifik peptid nukleik asit bazlı multipleks PZR yönteminin bla-GES- 2 identifikasyonunda standart PZR ve sekans yöntemlerine oranla daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (53). Enzim genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen DNA dizi analizi yöntemi ise halen altın standart olma özelliğini korumakla birlikte, maliyeti yüksek ve emek gerektiren bir yöntemdir.

3.MATERYAL ve METOT

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Nisan 2014-Temmuz 2014 tarihleri arasında çeşitli servislerdeki hastalardan gönderilen idrar örneklerinden etken olarak izole edilen Enterobacteriaceae ailesine mensup 150 izolat çalışma kapsamına alınmıştır. Örneklem sayısını belirlemek amacıyla G*Power (v3.1.7) programı kullanılarak güç analizi yapılmıştır. Çalışmanın gücü 1-β (β = II. tip hata olasılığı) olarak ifade edilir ve genel olarak araştırmaların %80 güce sahip olmaları gerekmektedir. Cohen'in etki büyüklüğü katsayılarına göre; iki bağımsız grup arası yapılacak olan değerlendirmelerin büyük etki büyüklüğüne (d=0.50) sahip olacağı varsayılarak yapılan hesaplamaya göre gruplarda en az 64 kişi olması gerektiğine ve çalışma sürecinde kayıplar olabileceği göz önünde bulundurularak gruplarda GSBL pozitif=76, GSBL negatif=74 olmak üzere toplamda 150 suş alınmasına karar verilmiştir. İzolat seçiminde aşağıdaki kriterler kullanılmıştır:

1- Rutinde duyarlılık testleri Vitek 2 (Biomerieux, Fransa) ile çalışılan örneklerden 3. kuşak sefalosporinlerden en az birine direnç gösterek GSBL pozitifliğinden şüphelenilen ve akabinde moleküler olarak da TEM, SHV ve CTX-M gen bölgelerinden en az birini taşıdığı gösterilmiş 76 izolat GSBL enzimi pozitif grup olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

2- Kontrol grubu; antibiyogram sonuçlarına göre 3. kuşak sefalosporinlerin tamamına duyarlı olup moleküler olarak TEM, SHV ve CTX-M gen bölgelerini içermeyen 74 izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan bütün izolatlara disk difüzyon yöntemiyle tarama ve fenotipik doğrulama testleri ile moleküler doğrulama testleri çalışılmıştır.

3.1.İzolatların tanımlanması ve saklanması

Laboratuvarımıza gönderilen idrar örnekleri kanlı ve Chrome agar besiyerlerine ekilmiştir. Üreyen kolonilerden Gram boyama yapılarak, Gram negatif kolonilerden MALDI-TOF MS (Biomerieux, Fransa) ile tanımlama yapılmıştır.

Suşlar duyarlılık testleri ve moleküler testler çalışılıncaya kadar %15 gliserol eklenmiş triptik soy broth içeren 2 ml'lik steril ependorf tüplerinde süspanse edilmiş ve -80°C'de saklanmıştır.

3.2.Fenotipik tarama ve doğrulama testleri

Çalışmaya alınan tüm suşların fenotipik tarama ve doğrulama testleri için temel olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Duyarlılık deneylerine başlamadan önce; -80 °C de stoklanan suşlar koyun kanlı agara tek koloni düşecek şekilde azaltma ekimi ile yayılmıştır. Besiyerleri 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek bakterilerin üremeleri sağlanmıştır. Daha sonra koyun kanlı agardaki (RTA, Türkiye) saf kolonilerden alınarak serum fizyolojik doldurulmuş tüplerde 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Steril bir eküvyon bakteri süspansiyonuna daldırılmış ve tüpten çıkarılmadan önce tüpün iç cidarına bastırılarak pamukta kalan fazla sıvı atılmıştır. İnokulum ile ıslatılan eküvyon, daha önce hazırlanmış ve yüzeyi kurutulmuş olan 4 mm kalınlığındaki Mueller Hinton Agar (Biomerieux, Fransa) besiyeri içeren petri plaklarının tüm yüzeyine sürülerek inokulumun eşit olarak yayılması sağlanmıştır. Antibiyotik diskleri yerleştirilmeden önce petri plağı üzerindeki fazla nemin uzaklaşması için yaklaşık 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra steril bir iğne ucu yardımıyla antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye), bir plakta en fazla 6 disk olacak ve Mueller Hinton Agar besiyerinin üzerine tam temas edecek şekilde uygun pozisyonda yerleştirilmiştir. Petriler 37˚C lik etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.1.Disk difüzyon tarama testi

Duyarlılık testi çalışılacak antibiyotik diskleri hem CLSI, hem de EUCAST kılavuzlarının önerdiği ESBL tarama disklerinden seçilmiştir. Bunun için iki Mueller

Hinton agar antibiyogram plağına test edilecek izolat yayıldıktan sonra seftazidim (30µg), seftazidim (10µg), sefotaksim (30µg), sefotaksim (5µg), aztreonam (30µg), sefpodoksim (10µg), seftriakson (30µg), sefepim (30µg) diskleri yerleştirilmiş ve inkübasyondan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel yardımıyla milimetrik olarak ölçülerek sonuçlar CLSI ve EUCAST kriterlerine göre ayrı ayrı yorumlanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2: CLSI/EUCAST Tarama Kriterleri

Antibiyotik	CLSI		EUCAST	
	Disk içeriği	**Zon çapı (mm)**	**Disk içeriği**	**Zon çapı (mm)**
Sefpodoksim	10 µg	≤ 17	10 µg	< 21
Seftazidim	30 µg	≤ 22	10 µg	< 22
Aztreonam	30 µg	≤ 27	30 µg	< 24
Sefotaksim	30 µg	≤ 27	5 µg	< 21
Seftriakson	30 µg	≤ 25	30 µg	< 23
Sefepim	30 µg	≤ 24	30 µg	< 24

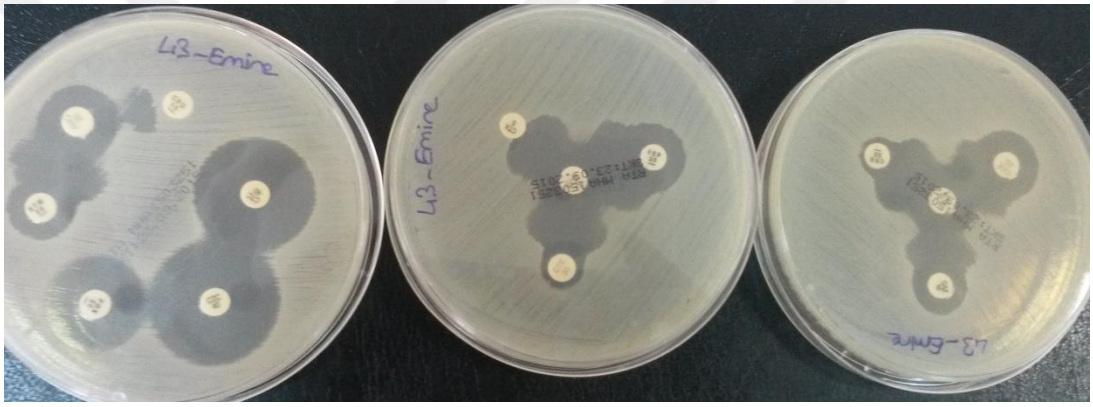
3.2.2.Fenotipik doğrulama testleri

3.2.2.1.Çift disk sinerji testi

Çift disk sinerji testinde, bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar plağına 3.2'de belirtildiği şekilde yayıldıktan sonra yukarıda sayılan tarama diskleri amoksisilin-klavulonat diski (20+10 µg) ile aralarında merkezden merkeze 20 mm olacak şekilde yerleştirilmiş ve inkübasyondan sonra test edilen sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 5).

3.2.2.2.Kombinasyon disk testi

Kombinasyon disk testinde seftazidim (30µg) ve seftazidim-klavulonat (30+10 µg) ile sefotaksim (30µg) ve sefotaksim-klavulonat (30+10 µg) diskleri antibiyogram plağına yerleştirilmiş, inkübasyondan sonra kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonunun, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olması, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: 18 saatlik inkübasyon sonunda GSBL üreten *E.coli* izolatının antibiyogram plak görüntüsü

3.3.Genotipik doğrulama testi

3.3.1.Bakteriyel genomun ekstraksiyonu

GSBL enzimlerinin moleküler yöntemlerle saptanması için suşlar Mueller-Hinton agar besiyerine pasajlanmıştır. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 200 µl Tris-Asetat-EDTA (TAE) buffer içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında süspanse edilmiştir. Daha sonra içi su dolu beher içinde köpük spora gömülmüş vaziyette 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır (Şekil 6). 13000

devirde 10 dakika santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatan amplifikasyon için kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 6: DNA ekstraksiyonu için izolatların kaynatılması

3.3.2.PZR çalışması

Çalışmada kullanılacak primer gruplarının ve PZR şartlarının belirlenmesinin ardından hasta örneklerinin PZR ile analizi aşamasına geçilmiştir. Her PZR reaksiyonu için 13 hasta örneğine ait DNA ile pozitif kontrol (PK) DNA'sı çalışılmıştır. PZR karışımı pipetaj hata payı da dahil edilerek 15 örnek için hazırlanmış, artan karışım miktarı kullanılmadan atılmıştır. Tüm PZR işlemi, öncesinde en az 20 dk steril edilmiş laminar kabin içerisinde, steril ekipmanla

gerçekleştirilmiştir. Karışımların hazırlanması sırasında PZR tüpleri, sıcaklıklarını korumak amacıyla -20°C dondurucudan çıkarılan özel zemin üzerine yerleştirilerek çalışılmıştır.

PZR master mix karışımı (Vivantis, Malezya), ddH2O, primerler ve çalışılacak DNA'lar sadece çözülmelerine yetecek süre kadar soğutucu dışında tutulmuş, kullanılmalarının hemen ardından dolaba kaldırılmıştır. PZR tüpleri karışımların pipetlenip vortekslenmesinin (Biosan, Litvanya) ardından thermal cycler'a (Techne, İngiltere) yerleştirilmiştir.

Her bir suş için TEM, SHV ve CTX-M gen bölgelerine özgül primer setleri (Tablo 3) kullanılarak thermal cycler cihazında 94°C'de ilk denatürasyonun ardından 94°C'de 1 dk denatürasyon, 58/62°C'de 1 dk birleşme, 72°C'de 1 dk uzama ile toplam 30 döngü olacak şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiş, 72°C'de 10 dk son uzama ile reaksiyona son verilmiştir.

PZR reaksiyonu tamamlandıktan sonra elde edilen PZR ürünleri ya bekletilmeden elektroforez jeline yüklenmiş ya da çalışılana dek -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3: Kullanılan Primerler ve Büyüklükleri

Hedeflenen Gen Bölgesi		Primer Dizilimi (5'-3')	Büyüklük (bç)
TEM	F	TCCGCTCATGAGACAATAACC	931
	R	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	
SHV	F	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	868
	R	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	
CTX-M	F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909
	R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC	

3.3.3.PZR Ürünlerinin Elektroforez İşlemi

Öncelikle 10X TAE tamponundan 100 ml, steril deiyonize sudan 900 ml alınmış ve 1000 ml'lik 1X TAE tamponu hazırlanmıştır. Sonrasında 40 ml 1X TAE tamponu içerisinde 0.6 gr agaroz (Lonza, ABD) eklenerek %1.5 konsantrasyonluk agaroz jel hazırlanmıştır. Karışım mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) çözdürülerek, içine DNA görüntülenmesi için boya (GelStar (Lonza, ABD)) eklenerek yükleme jel kalıbına dökülmüştür. Jel donduktan sonra elektroforez tankına (Bio-Rad, Çin) yerleştirilmiştir. Üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu jel üzerine eklenmiştir.

PZR ürünleri örnek numarasına göre sıraya dizilmiştir. Yüklemede 8 µl PZR ürünleri, 1 µl loading dye ile karıştırılarak sırayla kuyucuklara yerleştirilmiştir. Her PZR reaksiyonu için kullanılan pozitif kontrol de aynı şekilde jelin 7. kuyucuğuna yüklenmiştir.

100 bp'lik bantlara sahip olan 5 µl DNA ladder (marker) yine 0.5 µl loading dye ile karıştırılarak en son kuyucuğa yüklenmiştir.

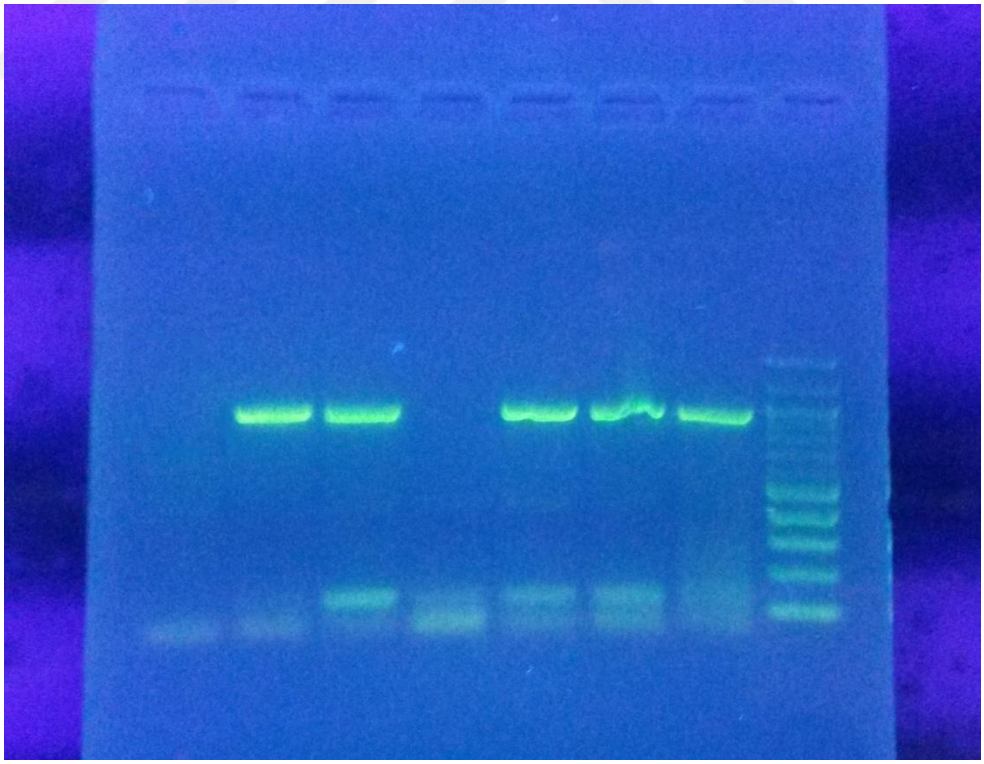
Elektroforez işlemi 75 V elektrik ile 40 dk süresince gerçekleştirilmiştir. Yürütme sonunda elektroforez tankından çıkarılan jel vakit kaybetmeden UV ışık altında incelemeye alınmıştır.

3.3.4.Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

Jelde yürütülen DNA'ların görüntülenmesi işleminde boyar madde olarak yüksek derecede kanserojen olan etidium bromid yerine bilinen toksik etkisi bulunmayan GelStar solüsyonu kullanılmıştır. 10.000X konsantrasyonda temin edilen GelStar, alikotlanarak -20°C'de saklanmış ve kısa süreli olarak soğutucudan çıkarılıp ışıktan saklanarak kullanılacağı miktarda alınıp yeniden soğutucuya konulmuştur.

Uygulama sırasında 40 ml olarak hazırlanan agaroz jelin içine, çözünme işlemi tamamlanıp kalıba dökmeden hemen önce 1 µl GelStar eklenmiştir. İyice karıştırılan çözelti donma, yükleme ve yürütme işlemleri sırasında boyanın etkinliğini kaybetmemesi için mümkün olduğunca ışıktan korunmuştur. Elektroforez sırasında boyaya tutunan DNA'lar, yürütme işlemi tamamlanır tamamlanmaz UV ışıkta incelenmiştir.

Işıma veren bantlar, markerdaki baz uzunlukları temel alınarak eşleştirilmiş ve hangi bakteri suşunda hangi direnç genlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Zayıf bile olsa ışıma görülmesi, bakteride ilgili plazmid veya gen bölgesinin az kopya olarak dahi olsa mevcut olduğu anlamına geldiğinden pozitif kabul edilmiştir. Elektroforez sonunda bantların görüntüsü Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: Elektroforez sonunda bantların translüminatördeki görüntüsü

3.4.İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanılmıştır. CLSI ve EUCAST kriterlerinin birbirleri ve moleküler yöntem ile aralarındaki uyum için McNemar ve Kappa uyum testi ve tanı tarama (spesifisite, sensitivite vb) testleri kullanılmıştır. Anlamlılık $p<0.05$ ve $p<0.01$ düzeylerinde değerlendirilmiştir.

Duyarlılık (Sensitivite): Gerçek hastalar içinden testin hastaları belirleyebilme özelliğidir.

Özgüllük (Spesifisite): Gerçek sağlamlar içinden testin sağlamları belirleyebilme özelliğidir.

Pozitif Kestirim Değeri: Test pozitif (hasta) sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten hasta olması durumunun koşullu olasılığının ölçüsüdür.

Negatif Kestirim Değeri: Test negatif (sağlam) sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten sağlıklı olma olasılığıdır.

4.BULGULAR

Çalışma Nisan 2014 – Temmuz 2014 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda moleküler olarak TEM, SHV veya CTX-M gen bölgelerinden en az birini taşıdığı gösterilmiş 76 GSBL pozitif ve bu gen bölgelerinden hiçbirini taşımayan 74 GSBL negatif izolat ile gerçekleştirilmiştir.

Olguların yaşları 18 ile 93 arasında değişmekte olup, ortalama 50.87±21.19 yıldır. Olguların %23.3'ü erkek, %76.7'si kadındır (Tablo 4).

Tablo 4: Demografik Özelliklerin Dağılımı

		Min-Mak (Medyan)	**Ort±SS**
Yaş (yıl)		18-93 (49.5)	50.87±21.19
		N	**%**
Cinsiyet	**Erkek**	35	23.3
	Kadın	115	76.7

Tablo 5: Bakterilerilerin türleri ve kliniklere göre dağılımları

		Toplam (n=150)		GSBL üreten (n=76)	
		N	%	N	%
Bakteri türü	*E.coli*	120	80	56	46.7
	K.pneumoniae	20	13.4	17	85
	P.mirabilis	8	5.3	2	25
	E.cloacae	2	1.3	1	50
Klinik türü	Üroloji	58	38.7	30	51.7
	Dahiliye	40	26.7	24	60
	Cerrahi	19	12.7	7	36.8
	Acil	16	10.6	5	31.3
	Yoğun Bakım	7	4.7	5	71.4
	Diğer	10	6.7	5	50

Olguların %80'inden *E.coli* izole edilmiş olup GSBL en sık *K.pneumoniae*'da (%85) ve özellikle yoğun bakım örneklerinde saptanmıştır (Tablo 5).

Tablo 6: GSBL direnç genlerinin bakteri türlerine göre dağılımları

	CTX-M (%)	TEM (%)	SHV (%)
E.coli	87.5	51.8	5.4
K.pneumoniae	70	35	20
P.mirabilis	100	-	-
E.cloacae	100	-	-
Toplam	86.8	47.4	9.2

GSBL pozitifliğinin %86.8'i CTX-M, %47.4'ü TEM ve %9.2'si SHV tipindedir (Tablo 6).

Tablo 7: GSBL üreten bakterilerin CLSI ve EUCAST kriterlerine göre bazı beta laktam antibiyotiklere duyarlılık oranları

n=76	**CLSI (%)**		**EUCAST (%)**	
	R	**S**	**R**	**S**
FEP	85.5	14.5	84.2	15.8
CRO	98.7	1.3	97.4	2.6
CAZ	61.8	30.2	80.3	19.7
CTX	98.7	1.3	98.7	1.3
CPD	98.7	1.3	100	-
ATM	97.4	2.6	86.8	13.2

FEP: Sefepim CRO: Seftriakson CAZ: Seftazidim

CTX: Sefotaksim CPD: Sefpodoksim ATM: Aztreonam

GSBL üreten izolatları saptamada en başarılı disk sefpodoksim olurken, seftazidim hem CLSI hem de EUCAST kriterlerine göre en başarısız disk olmuştur (Tablo 6).

Tablo 8: Sefepim CLSI/ Sefepim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

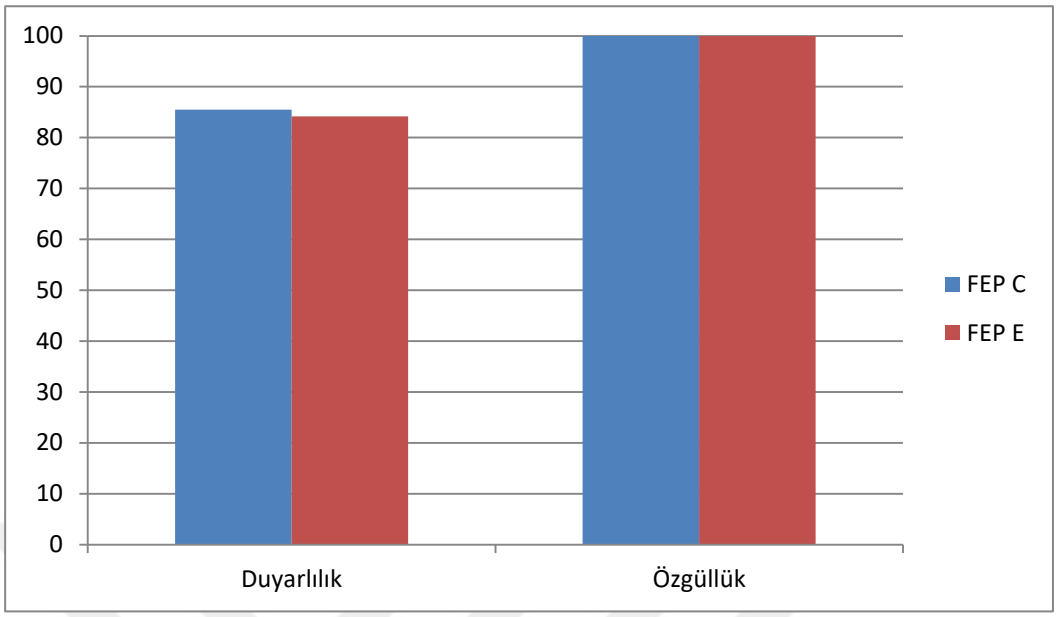
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
FEP C*	**Negatif**	74 (49.3)	11 (7.3)	85 (56.7)	***0.001****
	Pozitif	0 (0)	65 (43.3)	65 (43.3)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		85.53			
Özgüllük		100.00			
Pozitif Kestirim Değeri		100.00			
Negatif Kestirim Değeri		87.06			
Doğruluk		92.67			
FEP E*	**Negatif**	74 (49.3)	12 (8.0)	86 (57,3)	***0.001****
	Pozitif	0 (0)	64 (42.7)	64 (42.7)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		84.21			
Özgüllük		100.00			
Pozitif Kestirim Değeri		100.00			
Negatif Kestirim Değeri		86.05			
Doğruluk		92.00			

**FEP C: Sefepim CLSI* *McNemar Test* ***p<0.01*

**FEP E: Sefepim EUCAST*

CLSI kriterlerine göre sefepim diskinin duyarlılığı %85.53, özgüllüğü %100, doğruluğu %92.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %100 ve negatif kestirim değeri ise %87.06 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre sefepim diskinin duyarlılığı %84.21, özgüllüğü %100, doğruluğu %92 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %100 ve negatif kestirim değeri ise %86.05 olarak görülmektedir (Tablo 7).



Şekil 8: Sefepim CLSI/ Sefepim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

Sefepim diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri kendi aralarında uyum gösterirken (kappa uyum katsayısı: 0.986), hem CLSI hem de EUCAST kriterleri ile moleküler yöntem arasında uyum görülmemektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.854 ve 0.840) (Şekil 8).

Tablo 9: Seftriakson CLSI/ Sefrtiakson EUCAST Moleküler GSBL Uyumu

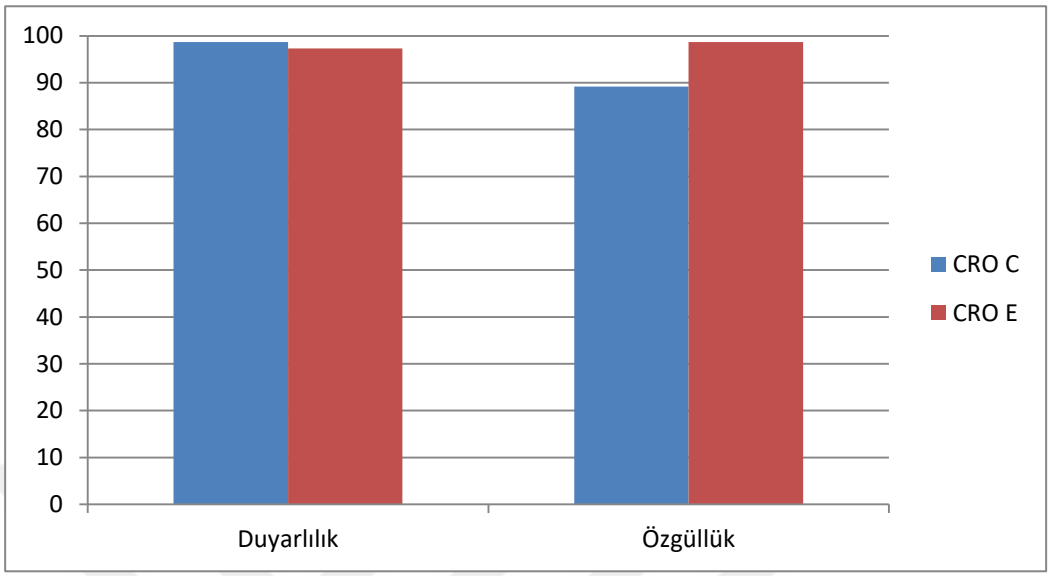
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
CRO C*	**Negatif**	66 (44.0)	1 (0.7)	67 (44.7)	***0.039****
	Pozitif	8 (5.3)	75 (50.0)	83 (55.3)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		98.68			
Özgüllük		89.19			
Pozitif Kestirim Değeri		90.36			
Negatif Kestirim Değeri		98.51			
Doğruluk		94.00			
CRO E*	**Negatif**	73 (48.7)	2 (1.3)	75 (50.0)	***1.000****
	Pozitif	1 (0.7)	74 (49.3)	75 (50.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		97.37			
Özgüllük		98.65			
Pozitif Kestirim Değeri		98.67			
Negatif Kestirim Değeri		97.33			
Doğruluk		98.00			

**CRO C: Seftriakson CLSI* *McNemar Test* ***p<0.05*

**CRO E: Seftriakson EUCAST*

CLSI kriterlerine göre seftriakson diskinin duyarlılığı %98.68, özgüllüğü %89.19, doğruluğu %94 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %90.36 ve negatif kestirim değeri ise %98.51 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre seftriakson diskinin duyarlılığı %97.37, özgüllüğü %98.65, doğruluğu %98 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %98.67 ve negatif kestirim değeri ise %97.33 olarak görülmektedir (Tablo 8).



Şekil 9: Seftriakson CLSI/ Sefrtiakson EUCAST Moleküler GSBL Uyumu

Seftriakson diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri kendi aralarında uyum göstermemektedir (kappa uyum katsayısı: 0.986). Seftriakson diski için CLSI kriterleri ile moleküler yöntem arasında uyum görülmezken, moleküler yöntem ile EUCAST kriterleri arasında uyum görülmektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.880 ve 0.960) (Şekil 9).

Tablo 10: Seftazidim CLSI/ Seftazidim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

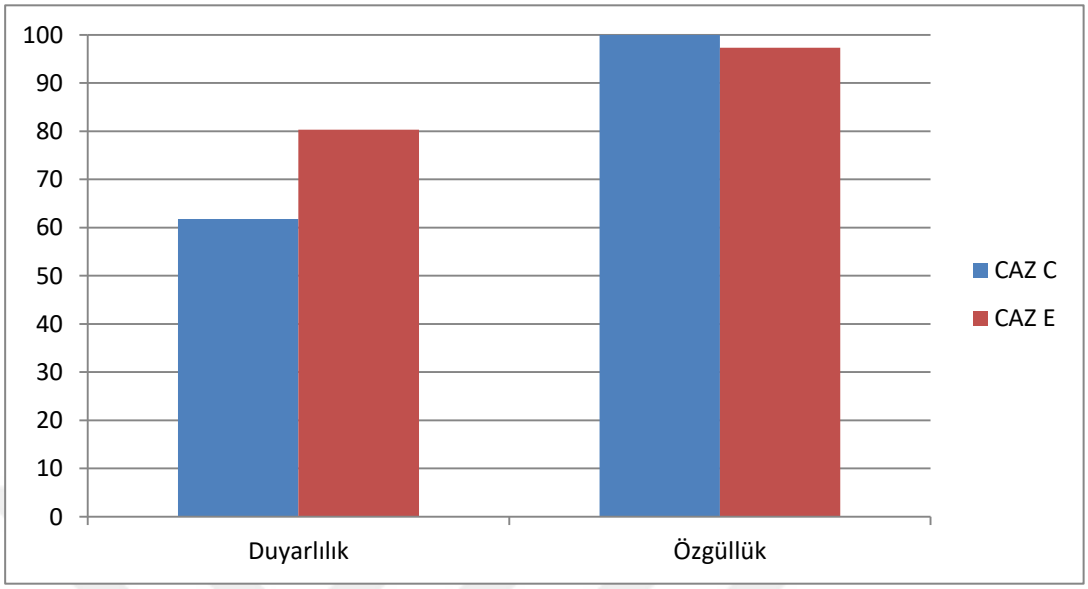
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
CAZ C	**Negatif**	74 (49.3)	29 (19.3)	103 (68.7)	***0.001****
	Pozitif	0 (0)	47 (31.3)	47 (31.3)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		61.84			
Özgüllük		100.00			
Pozitif Kestirim Değeri		100.00			
Negatif Kestirim Değeri		71.84			
Doğruluk		80.67			
CAZ E	**Negatif**	72 (48.0)	15 (10.0)	87 (58.0)	***0.002****
	Pozitif	2 (1.3)	61 (40.7)	63 (42.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		80.26			
Özgüllük		97.30			
Pozitif Kestirim Değeri		96.83			
Negatif Kestirim Değeri		82.76			
Doğruluk		88.67			

**CAZ C: Seftazidim CLSI* *McNemar Test* ***p<0.01*

**CAZ E: Seftazidim EUCAST*

CLSI kriterlerine göre seftazidim diskinin duyarlılığı %61.84, özgüllüğü %100, doğruluğu %80.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %100 ve negatif kestirim değeri ise %71.84 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre seftazidim diskinin duyarlılığı %80.26, özgüllüğü %97.3, doğruluğu %88.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %96.83 ve negatif kestirim değeri ise %82.76 olarak görülmektedir (Tablo 9).



Şekil 10: Seftazidim CLSI/ Seftazidim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

Seftazidim diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri kendi aralarında uyum göstermemektedir (kappa uyum katsayısı: 0.773). Seftazidim diski için hem CLSI hem de EUCAST kriterleri ile moleküler yöntem arasında uyum görülmemektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.615 ve 0.774) (Şekil 10).

Tablo 11: Sefotaksim CLSI/ Sefotaksim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

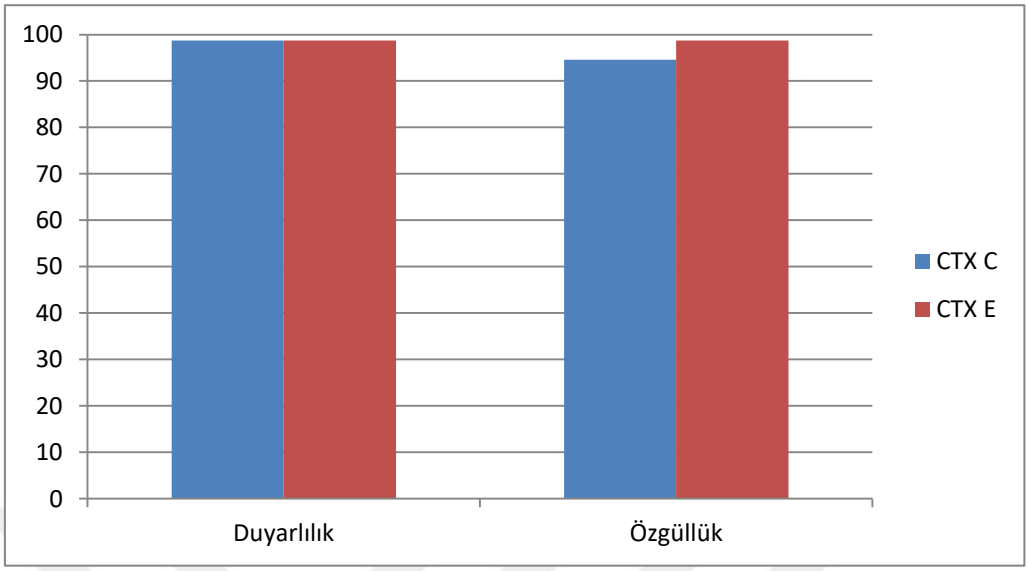
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
CTX C	**Negatif**	70 (46.7)	1 (0.7)	71 (47.3)	***0.375***
	Pozitif	4 (2.7)	75 (50.0)	79 (52.7)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		98.68			
Özgüllük		94.59			
Pozitif Kestirim Değeri		94.94			
Negatif Kestirim Değeri		98.59			
Doğruluk		96.67			
CTX E	**Negatif**	73 (48.7)	1 (0.7)	74 (49.3)	***1.000***
	Pozitif	1 (0.7)	75 (50.0)	76 (50.7)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		98.68			
Özgüllük		98.65			
Pozitif Kestirim Değeri		98.68			
Negatif Kestirim Değeri		98.65			
Doğruluk		98.67			

**CTX C: Sefotaksim CLSI* *McNemar Test*

**CTX E: Sefotaksim EUCAST*

CLSI kriterlerine göre sefotaksim diskinin duyarlılığı %98.68, özgüllüğü %94.59, doğruluğu %96.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %94.94 ve negatif kestirim değeri ise %98.59 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre sefotaksim diskinin duyarlılığı %98.68, özgüllüğü %98.65, doğruluğu %98.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %98.68 ve negatif kestirim değeri ise %98.65 olarak görülmektedir (Tablo 10).



Şekil 11: Sefotaksim CLSI/ Sefotaksim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

Sefotaksim diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri hem kendi aralarında (kappa uyum katsayısı: 0.960) hem de moleküler yöntem ile uyumlu bulunmuştur (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.933 ve 0.973) (Şekil 11).

Tablo 12: Sefpodoksim CLSI/ Sefpodoksim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

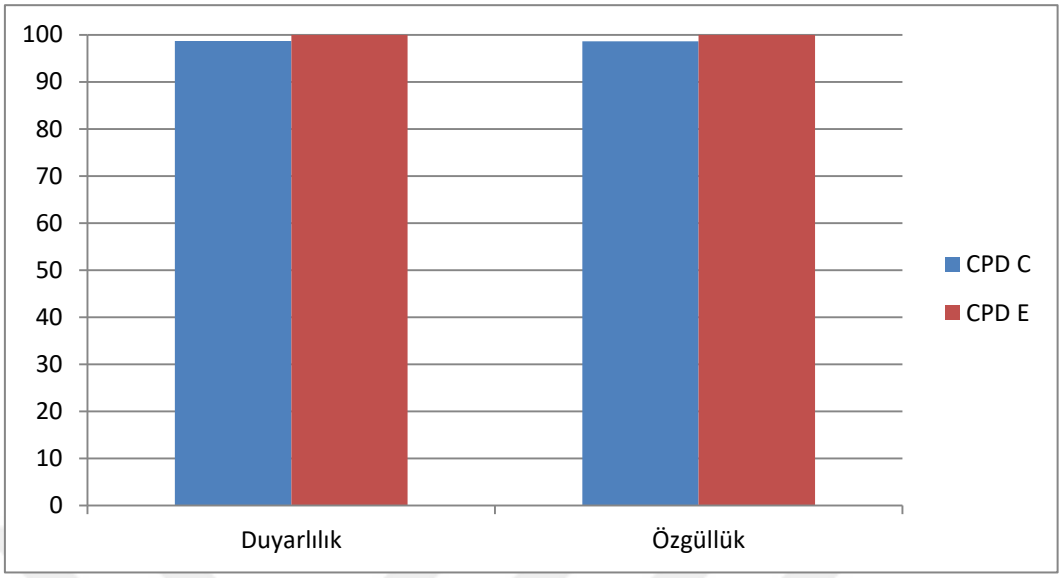
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
CPD C	**Negatif**	73 (48.7)	1 (0.7)	74 (49.3)	***1.000***
	Pozitif	1 (0.7)	75 (50.0)	76 (50.7)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		98.68			
Özgüllük		98.65			
Pozitif Kestirim Değeri		98.68			
Negatif Kestirim Değeri		98.65			
Doğruluk		98.67			
CPD E	**Negatif**	74 (49.3)	0 (0)	74 (49.3)	***1.000***
	Pozitif	0 (0)	76 (50.7)	76 (50.7)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		100.00			
Özgüllük		100.00			
Pozitif Kestirim Değeri		100.00			
Negatif Kestirim Değeri		100.00			
Doğruluk		100.00			

**CPD C: Sefpodoksim CLSI* *McNemar Test*

**CPD E: Sefpodoksim EUCAST*

CLSI kriterlerine göre sefpodoksim diskinin duyarlılığı %98.68, özgüllüğü %98.65, doğruluğu %98.67 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %98.68 ve negatif kestirim değeri ise %98.65 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre sefpodoksim diskinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %100, doğruluğu %100 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %100 ve negatif kestirim değeri ise %100 olarak görülmektedir (Tablo 11).



Şekil 12: Sefpodoksim CLSI/ Sefpodoksim EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

Sefpodoksim diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri hem kendi aralarında (kappa uyum katsayısı: 0.973) hem de moleküler yöntem ile uyum göstermektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.973 ve 1.000) (Şekil 12).

Tablo 13: Aztreonam CLSI/ Aztreonam EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

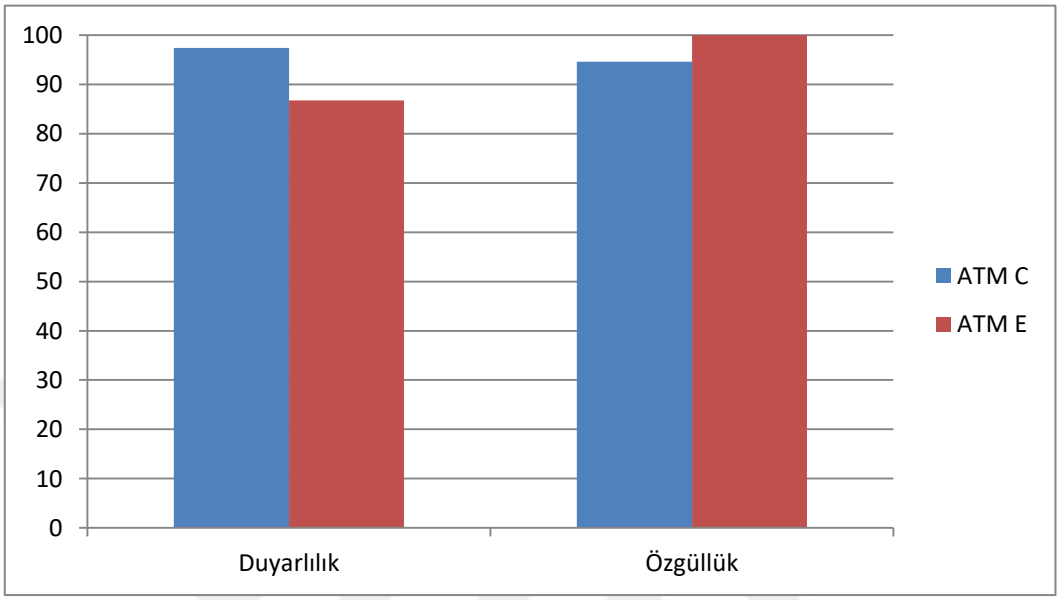
		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
ATM C	**Negatif**	70 (46.7)	2 (1.3)	72 (48.0)	***0.687***
	Pozitif	4 (2.7)	74(49.3)	78 (52.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		97.37			
Özgüllük		94.59			
Pozitif Kestirim Değeri		94.87			
Negatif Kestirim Değeri		97.22			
Doğruluk		96.00			
ATM E	**Negatif**	74 (49.3)	10 (6.7)	84 (56.0)	***0.002*****
	Pozitif	0 (0)	66 (44.0)	66 (44.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		86.84			
Özgüllük		100.00			
Pozitif Kestirim Değeri		100.00			
Negatif Kestirim Değeri		88.10			
Doğruluk		93.33			

**ATM C: Aztreonam CLSI* *McNemar Test*

**ATM E: Aztreonam EUCAST*

CLSI kriterlerine göre aztreonam diskinin duyarlılığı %97.37, özgüllüğü %94.59, doğruluğu %96.00 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %94.87 ve negatif kestirim değeri ise %97.22 olarak görülmektedir.

EUCAST kriterlerine göre aztreonam diskinin duyarlılığı %86.84, özgüllüğü %100, doğruluğu %93.33 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %100 ve negatif kestirim değeri ise %88.10 olarak görülmektedir (Tablo 12).



Şekil 13: Aztreonam CLSI/ Aztreonam EUCAST ile Moleküler GSBL Uyumu

Aztreonam diski ile GSBL tayininde CLSI ve EUCAST kriterleri kendi aralarında uyum göstermemektedir (kappa uyum katsayısı: 0.841). Aztreonam diski için CLSI kriterleri ile moleküler yöntem arasında uyum görülürken EUCAST kriterleriyle uyum görülmemektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.920 ve 0.867) (Şekil 13).

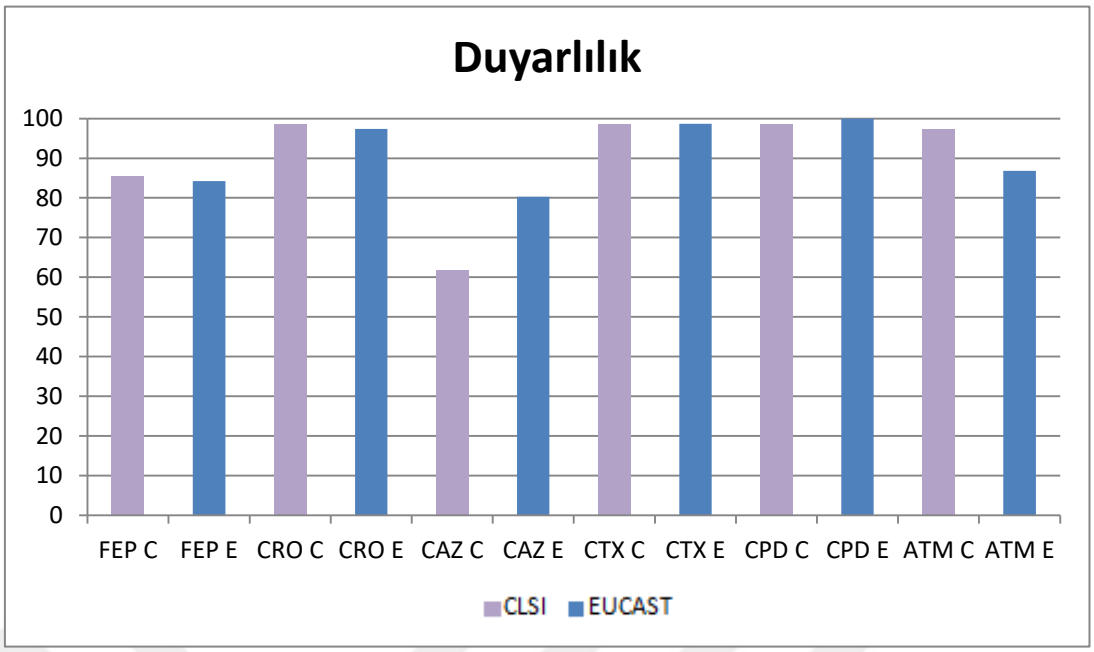
Tarama testlerinde duyarlılığı en yüksek disk EUCAST kriterlerine göre yorumlanan sefpodoksim olurken, en düşük disk seftazidim (hem CLSI hem EUCAST kriterlerine göre) olmuştur. (Tablo 13, Şekil 14 ve 15)

Tablo 14: Moleküler GSBL ile tarama testlerinin uyumu

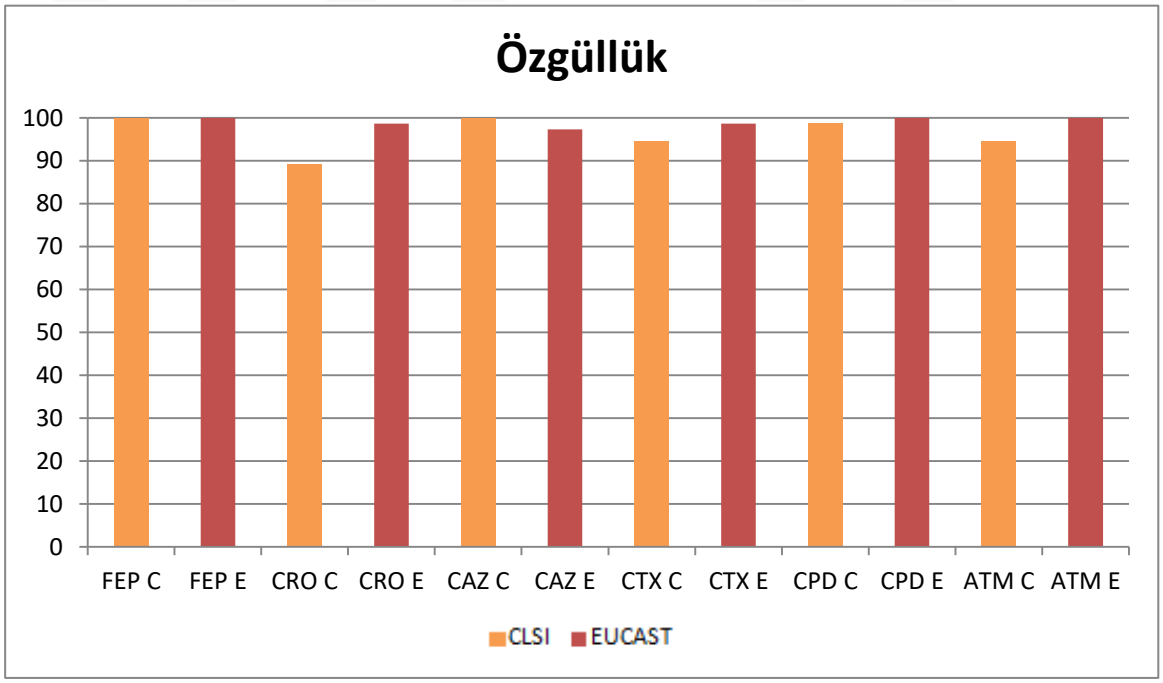
	FEP C	FEP E	CRO C	CRO E	CAZ C	CAZ E	CTX C	CTX E	CPD C	CPD E	ATM C	ATM E
Duyarlılık	85.5	84.2	98.7	97.4	61.8	80.3	98.7	98.7	98.7	100.0	97.4	86.8
Özgüllük	100.0	100.0	89.2	98.7	100.0	97.3	94.6	98.7	98.7	100.0	94.6	100.0
PKD*	100.0	100.0	90.4	98.7	100.0	96.8	94.9	98.7	98.7	100.0	94.9	100.0
NKD**	87.1	86.1	98.5	97.3	71.8	82.8	98.6	98.7	98.7	100.0	97.2	88.1
Doğruluk	92.7	92.0	94.0	98.0	80.7	88.7	96.7	98.7	98.7	100.0	96.0	93.3

**PKD: Pozitif kestirim değeri*

***NKD: Negatif kestirim değeri*



Şekil 14: Tarama testlerinin duyarlılıkları



Şekil 15: Tarama testlerinin özgüllükleri

Tablo 15: CZC/ CTC ile Moleküler GSBL Uyumunun Değerlendirilmesi

		Moleküler GSBL			
		Negatif	**Pozitif**	**Toplam**	
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	***P***
CZC*	**Negatif**	73 (48.7)	17 (11.3)	90 (60.0)	***0.001****
	Pozitif	1 (0.7)	59 (39.3)	60 (40.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		77.63			
Özgüllük		98.65			
Pozitif Kestirim Değeri		98.33			
Negatif Kestirim Değeri		81.11			
Doğruluk		88.00			
CTC*	**Negatif**	71 (47.3)	1 (0.7)	72 (48.0)	***0.625***
	Pozitif	3 (2.0)	75 (50.0)	78 (52.0)	
	Toplam	74 (49.3)	76 (50.7)	150 (100)	
Duyarlılık		98.68			
Özgüllük		95.95			
Pozitif Kestirim Değeri		96.15			
Negatif Kestirim Değeri		98.61			
Doğruluk		97.33			

**CZC: Seftazidim ve seftazidim/klavulonat McNemar Test **p<0.01*

**CTC: Sefotaksim ve sefotaksim/klavulonat*

Kombinasyon yöntemiyle GSBL tayininde Seftazidim+seftazidim/ klavulonat ile moleküler yöntem arasında uyum görülmezken Sefotaksim+ sefotaksim/klavulonat ile moleküler yöntem arasında uyum görülmektedir (kappa uyum katsayısı sırasıyla 0.761 ve 0.947). Bu iki doğrulama yöntemi kendi aralarında uyum göstermemektedir (kappa uyum katsayısı: 0.735).

Seftazidim+seftazidim/klavulonat diskleriyle kombinasyon yönteminin duyarlılığı %77.63, özgüllüğü %98.65, doğruluğu %88 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %98.33 ve negatif kestirim değeri ise %81.11 olarak görülmektedir.

Sefotaksim+sefotaksim/klavulonat diskleriyle kombinasyon yönteminin duyarlılığı %98.68, özgüllüğü %95.95, doğruluğu %97.33 olarak saptanmıştır. Pozitif kestirim değeri %96.15 ve negatif kestirim değeri ise %98.61 olarak görülmektedir (Tablo 14).

Tablo 16: GSBL pozitif izolatlarda doğrulama testlerinin duyarlılıkları

Doğrulama testi	**Pozitif (%)**
CTX (EUCAST) + AMC	100
CAZ (EUCAST) + AMC	89.5
CTX (CLSI) + AMC	100
CAZ (CLSI) + AMC	89.5
FEP + AMC	98.7
CPD + AMC	100
ATM + AMC	97.4
CRO + AMC	100
CZC	77.6
CTC	98.7

AMC: Amoksisilin-klavulonat *FEP: Sefepim*

CAZ: Seftazidim *CPD: Sefpodoksim*

CTX: Sefotaksim *CZC: Seftazidim+seftazidim/klavulonat*

CRO: Seftriakson *CTC: Sefotaksim+sefotaksim/klavulonat*

ATM: Aztreonam

Çift disk sinerji testinde sefotaksim (hem CLSI hem EUCAST diskleri), sefpodoksim ve seftriakson diskleri ile amoksisilin klavulonat diskleri arasında tüm izolatlarda sinerji saptanmış olup; bu oran seftazidim (CLSI ve EUCAST) için %89.5, sefepim için %98.7, aztreonam için %97.4 olarak bulunmuştur. Kombinasyon yöntemlerinde bu oran seftazidim + seftazidim/klavulonat için %77.6; sefotaksim + sefotaksim/klavulonat için %98.7 olarak saptanmıştır (Tablo 15).

5.TARTIŞMA

GSBL üreten mikroorganizmalar günümüzde önemli bir sorun olup, prevalansı ülkeden ülkeye değişmektedir. Araştırmacılar tarafından farklı ülkelerde hasta izolatlarında yapılan çalışmalarda, *E.coli* ve *Klebsiella spp*.'de saptanan en yüksek GSBL oranlarının Hindistan (≥ %80) ve Çin'de (≥ %60) olduğu bildirilmiştir (54,55). Bu oranlar Doğu ve Güneydoğu Asya, Latin Amerika, ve Güney Avrupa'da %30'un üzerinde iken Avusturalya, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da %5-10 olarak bulunmuştur (56). Ülkemizden yapılan birçok çalışmada GSBL sıklığı merkezler arasında farklılık göstermekte olup bu oran %10-75 arasında değişmektedir (57-61).

GSBL üreten enfeksiyon etkenlerinin izole edildikleri bölümler değişkenlik göstermekle birlikte, birçok çalışmada ilk sırayı yoğun bakım servisleri almaktadır (62,63). Bizim çalışmamızda da en yüksek GSBL oranı yoğun bakımda (%71.4) bulunmuşken bunu dahiliye ve üroloji servisleri takip etmiştir.

İlk GSBL üreten suşun 1983 yılında ortaya çıkışından 2010 yılına kadar Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak çeşitli tarama ve doğrulama testleriyle GSBL varlığı araştırılmakta ve pozitiflik durumunda; antibiyotik duyarlılık testleri karbapenem dışındaki beta laktam antibiyotikler için CLSI önerilerine göre duyarlı sonuçlar dirençli; EUCAST önerilerine göre duyarlı sonuçlar orta duyarlı, orta duyarlı sonuçlar dirençli olarak değiştirilerek raporlanmaktaydı. 2010 yılından itibaren, CLSI'ın GSBL üreten Enterobacteriaceae üyeleri için sefalosporin duyarlılığının in vitro "saptandığı biçimiyle" raporlanmasını önermesinin ardından sonuçlar GSBL mevcudiyetinde değiştirilmeden bildirilmektedir. EUCAST de benzer şekilde GSBL üreten bakterileri saptayabilmek için disk difüzyon testinde duyarlılık sınırından yüksek zon çapında bir sınırı tarama testi için önermekle birlikte, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında GSBL üretimini doğrulamaya yönelik ek testlerin rutin olarak yapılmasına gerek olmadığını belirtmektedir. Bu yeni kararların gerekçeleri şöyle açıklanmaktadır:

1- Farmakodinamik modellemeye göre sefalosporin sınır değeri 1-4mg/L'ye düşürüldüğünde ve maksimum sefalosporin dozajı uygulandığında serum konsantrasyonu, ihtiyaç duyulan %40-%50 dozaj intervalinin üzerine çıkabilmektedir.

2- Hayvan deneyleri, MİK'leri birbirine yakın, GSBL üreten ve üretmeyen iki suşun tedavisinde sefalosporin kullanımının etkinliğinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir.

3- GSBL üretmesine rağmen "sefalosporin duyarlı" görünen şuşların yol açtığı enfeksiyonlarda sefalosporinle tedavi başarısızlığı çoğunlukla 2009 CLSI ve öncesindeki MİK duyarlılık sınırdeğerleri dolaylarında (8-16mg/L) yaşanmaktadır. Yani -izolat GSBL üretsin ya da üretmesin- ilgili sefalosporinin MİK'i düştükçe tedavi başarısı artmaktadır (64-66). Bu uygulama ile sekonder bir kazanç olarak yeni antibiyotiklerin keşiflerinin azalması ve artan direnç problemi nedeniyle mevcut antibiyotiklerin kullanımının artırılması hedeflenmektedir.

Yeni zon çaplarının uygulamaya girmesiyle sefalosporinleri "saptandığı biçimiyle" raporlama önerisini irdeleyen birçok çalışma yapılmıştır. Livermore ve arkadaşları (67) 2012 yılında yayınladıkları makalelerinde, sefalosporin MİK'i düşük bulunsa da GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlarda hala hatırı sayılır tedavi başarısızlığıyla sonuçlanan vakaların olduğunu, ayrıca araştırma amaçlı yapılan analizlerle rutin antibiyogram sonuçlarının aynı özenin gösterilmemesinden dolayı bir tutulamayacağını ve birçok laboratuvarın sadece epidemiyolojik amaçlı GSBL saptama testi yapmamasından dolayı enfeksiyon kontrolüne zarar verebilecek veri kaybının kaçınılmaz olduğunu öne sürmüşlerdir.

Bu bilgiler GSBL üretiminin tespitinin hala önemini koruduğunu bize göstermektedir. Günümüzde çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, kullandıkları kriterler doğrultusunda GSBL doğrulama testlerini uygulamaya son verdiklerinden dolayı tarama testleri bir adım öne çıkmaktadır.

Wang ve arkadaşları (68) 2011 yılında yaptıkları çalışmada CLSI'ın arttırılmış zon çaplarına göre 158 GSBL ürettiği moleküler yöntemlerle saptanmış *E.coli* izolatının %41.8'ini seftazidime, %45.6'sını sefepime duyarlı olarak bulmuştur. Song ve arkadaşları (69) çalışmalarında 94 GSBL üreten Enterobacteriaceae üyesi izolatın %27,7'sini seftazidime, %39.4'ünü aztreonama, %75.5'ini sefepime duyarlı bulmuşlardır. Poulou ve arkadaşları (70) GSBL ürettiği saptanan 162 izolatın %13.6'sını seftazidime, %28.4'ünü sefepime ve %19.8'ini aztreonama duyarlı saptamışlardır. Biz de çalışmamızda benzer şekilde CLSI kriterlerine göre GSBL üreten izolatlarda seftazidim duyarlılığını %29.2, sefepim duyarlılığını %14.5 olarak bulduk. Bu oranlar sadece tarama testi kullanılmasının GSBL üretiminin tespitinde yetersiz kaldığını göstermektedir.

Türkiye'de antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (AMDT) uygulanışında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde uzun yıllardır CLSI standartları kullanılmaktadır. ESCMID (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği) tarafından 2000 yılında kurulan EUCAST, Avrupa'nın resmi AMDT komitesi görevini üstlenmiştir. EUCAST'ın tüm dokümanlarına serbest erişim sağlaması gibi yararlar ve Türkiye'nin Avrupa çapında uluslararası sürveyans çalışmalarına katılabilmesi için EUCAST'ı kullanması gerekliliği gibi etmenler nedeniyle Türkiye'de EUCAST standartlarının kullanılması kararı alınmıştır. Ek olarak coğrafik yakınlığımız nedeniyle direnç profillerimizin ve duyarlılık paternlerimizin Avrupa izolatlarına daha yakın olabileceği öngörülerek bu değişime gidilmiştir. EUCAST ve CLSI'ın bazı disk içerikleri, kullanılacak besiyerleri, bazı bakteri ve antibiyotik kombinasyonları için duyarlılık sınırdeğerleri açısından birtakım farklılıkları mevcuttur. Bu farklardan biri de Enterobacteriaceae ailesine mensup bakterilerin GSBL üretiminin araştırılmasında kullanılan disklerin içeriği ve duyarlılık sınırdeğerleridir (71).

2010 yılı sonrasında GSBL üretiminin saptanmasında iki komitenin kriterlerini kıyaslayan birçok çalışma yapılmıştır. Blandino ve arkadaşları (72) 2014 yılında yaptıkları çalışmada 200 GSBL üreten izolatın tamamını EUCAST ve CLSI kriterlerini kullanarak sefepim, seftazidim, sefotaksim ve aztreonama dirençli olarak bulduklarını rapor etmişlerdir. Rodriguez-Bano ve arkadaşları (73) 191 GSBL üreten *E.coli* ile yaptıkları çalışmada seftazidim duyarlılığını %58.6 (CLSI) ve %14.7 (EUCAST); sefepim duyarlılığını %35.1 (CLSI) ve %14.7 (EUCAST) olarak bulmuşlardır. Hombach ve arkadaşları (74) 150 GSBL üreten Enterobacteriaceae ailesi mensubu izolatla yaptığı çalışmada CLSI ve EUCAST kriterleri uygulandığında izolatları seftazidim ve sefepime sırasıyla %38.7 ve %28, %58.7 ve %24 oranında duyarlı olarak bulmuştur; sefpodoksim, sefotaksim ve seftriakson için sonuçlar benzerdir. Söz konusu çalışmada EUCAST'in sınır değerleri seftazidim ve sefepim kullanıldığı durumda bir adım öne çıkmıştır. Biz çalışmamızda GSBL üretenlerde tarama sonuçlarını seftriakson, sefpodoksim, sefotaksim ve sefepim için benzer olarak bulmakla birlikte CLSI ve EUCAST kriterlerini kullanarak sırasıyla; seftazidime %29.2 ve %19.7; aztreonama %2.6 ve %13.2 oranlarında duyarlı olarak bulduk. Buna göre çalışmamızda seftazidim için EUCAST kriteri daha başarılıyken aztreonam için CLSI kriteri daha başarılı olarak bulunmuştur. Bu durumun EUCAST'in tarama kriterlerinde aztreonama yer vermemesinden dolayı çalışmamızda rutin duyarlılık kriterini baz almamızdan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Pollfuss ve arkadaşları (75) 118'i GSBL üreten 236 Enterobacteriaceae izolatı ile CLSI ve EUCAST kriterlerinin sefalosporin tarama zonlarını kullanarak her bir ajan için duyarlılık ve özgüllük belirleyen bir çalışma yapmıştır. Buna göre duyarlılığı en yüksek ajan, EUCAST kriterleri kullanılarak yorumlanan sefpodoksim iken özgüllüğü en yüksek ajan, CLSI kriterleri kullanılarak yorumlanan sefepim olmuştur. Bu durumu izolatların içinde Amp C ile maskelenen GSBL üreten izolatların varlığına bağlamışlardır. Bizim çalışmamızda sadece sefoksitin duyarlı izolatlar çalışmaya dahil edildiği için tamamen olmasa da Amp C maskelemesinin önüne geçildiğini düşünmekteyiz. Çalışmamıza göre en yüksek duyarlılık ve özgüllük EUCAST kriterlerine göre yorumlanan sefpodoksim diskinde görülmektedir. Diğer duyarlılık ve özgüllük dengesi iyi diskler sırasıyla sefpodoksim

(CLSI), sefotaksim ve seftriakson olmuştur. Özgüllükteki başarısına rağmen özellikle duyarlılıktaki düşüklüğü sebebiyle seftazidim en başarısız ajan olarak görülmektedir. Bu durumun çalışmamızda CTX-M tipi beta laktamazın fazla sayıda mevcut olması, ve bu tip beta laktamazların seftazidim üzerine nispeten etkisiz olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

EUCAST seftazidim tarama testi için 10 µg disk, sefotaksim için 5 µg disk önerirken kombinasyon disk difüzyon yöntemiyle yapılan doğrulama testinde hem seftazidim hem sefotaksim için 30 µg'lık disk kullanmayı önermektedir. Bu önerinin GSBL saptama oranını arttıracağı düşünülmekle birlikte rutinde farklı disklere ihtiyaç duyulmasının birtakım kullanım zorluklarına sebep olabileceği kanısındayız. Bizim çalışmamızda sefotaksim tarama testinin duyarlılığı her iki komitenin önerileri doğrultusunda aynı bulunmuşken, seftazidim duyarlılığı EUCAST kriterlerine göre CLSI kriterlerinden %9.5 daha yüksek bulunmuştur.

GSBL doğrulama testlerine yönelik itirazlar arasında, bu testlerin rutin duyarlılık testinden sonra yapılması halinde antibiyogram sonucunda bir günlük bir gecikmeye sebep olacak olması bulunmaktadır. Bu durum özellikle kritik hasta populasyonlarında uygun tedavinin geciktirilmesine ve tedavi başarısızlığına sebep olabilmektedir (76,77). Bunun önüne geçebilmek için çeşitli stratejiler izlenebilir. Düşük bütçeli laboratuvarlarda rutin antibiyogram diskleriyle eş zamanlı olarak doğrulama testine ait diskler konulabilmektedir. Bütçesi daha yüksek laboratuvarlarda ise klinik materyalden direk çalışılmaya izin vererek GSBL tespitini oldukça hızlandıran kolorimetrik sistemler ya da microarray sistemleri kullanılabilmektedir. Otomatize sistem kullanılan laboratuvarlarda ise Vitek 2 (Biomerieux, Fransa), Phoenix (BD, ABD) ve Microscan (Dade Behring, ABD) gibi sistemler yardımıyla GSBL tespiti eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilmektedir (67).

Rutinde antibiyotik duyarlılık testlerinde yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlerin GSBL tespitinde kullandıkları yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Wiegand ve arkadaşlarının (78) yaptıkları çalışmada duyarlılık ve özgüllükler

sırasıyla Vitek 2 için %86 ve %78, Phoenix için %99 ve %52, Microscan için %84 ve %73 olarak saptanmıştır. Sullivan ve arkadaşlarının (79) çalışmalarında otomatize sistemlerin duyarlılıklarının %80-99, özgüllüklerinin %50-80 aralığında değiştiği ortaya konmaktadır. Bizim laboratuvarımızda Vitek 2 sistemi bulunmaktadır ve çalışmaya dahil ettiğimiz izolatlar için verdiği sonuçlar %97.4 duyarlılık, %94.6 özgüllüğe sahiptir. Bu oranlar literatürle uyumlu olmakla birlikte çalışmaların genelinden yüksektir. Biz özellikle duyarlılıktaki bu yüksekliğin çalışmamıza sefoksitine dirençli izolatlar dahil edilmediği için AmpC gibi duyarlılığı etkileyebilecek faktörlerin önüne geçilmesinden kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Son yıllarda doğrulama testlerinin duyarlılığını kıyaslayan çalışmalar da önemini korumaktadır. Mangaiyarkarasi ve arkadaşları (80) 84 GSBL üreten izolatla yaptıkları çalışmada ÇDS yönteminin duyarlılığını %84.5; kombinasyon disk yönteminin duyarlılığını %61.9 olarak bulmuşlardır. De Gheldre ve arkadaşları (81) 105 GSBL pozitif, 94 GSBL negatif izolatla yaptıkları çalışmada sefotaksim ile sefotaksim klavulonat (CTC) ve seftazidim ile seftazidim klavulonat (CZC) için duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %88, %92 ve %90, %92 olarak saptamışlardır. Garrec ve arkadaşları (82) 107 Enterobacteriaceae izolatıyla yaptıkları çalışmada çift disk sinerji testinde en başarılı performansı sefepim ve aztreonam ile elde etmişlerdir. Kombinasyon disk yönteminde CTC ile CZC'nin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %85 ve %89 ile %75 ile %91 olup duyarlılık ve özgüllük dengesi açısından CTC'nin daha başarılı olduğu görülmüştür. Biz de çalışmamızda doğrulama testlerinden kombinasyon disk yöntemi ve çift disk sinerji yöntemlerini kullandık. En yüksek duyarlılık ve özgüllük çift disk sinerji testinde sefotaksim, sefpodoksim ve seftriakson (%100); kombinasyon disk yönteminde ise sefotaksim + sefotaksim klavulonat diskiyle (%98.7) elde edilmiştir. Çalışmamızda tarama testlerinin bazı diskleriyle doğrulama testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmektedir. Genel olarak tarama testlerinin başarısı yüksek olmakla birlikte EUCAST kriterlerine göre yorumlanan sefpodoksim diskinin performansının en yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Sadece tarama testi uygulanan bir laboratuvarda tek disk olarak tercih yapılacaksa sefpodoksim, sefotaksim ya da seftriakson tercih edilebilir.

Çalışmamızda tarama ve doğrulama testlerini güvenilir bir şekilde kıyaslayabilmek ve verilerimizin güvenilirliğini arttırmak adına altın standart yöntem olarak izolatların GSBL üretimi moleküler yöntemle araştırılmıştır. Bunun için en sık görülen genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretiminden sorumlu gen bölgelerinin varlığını PCR yardımıyla araştırdık. Sıralaması değişmekle birlikte Türkiye ve dünyada en sık görülen gen bölgeleri CTX-M, SHV ve TEM olarak gözlenmektedir. Hombach ve arkadaşları (74) 150 GSBL üreten izolatın %92'sinde CTX-M, %7.3'ünde SHV, %0.7'sinde TEM tipi GSBL olduğunu saptamışlardır. Polsfuss ve arkadaşları (75) 118 izolatın %89.8'inde CTX-M, %9.3'ünde SHV, %1.7'sinde TEM tipi GSBL bulmuşlardır. Türkiye'de ise Görgeç ve arkadaşları (83) 2015 yılında Malatya'da 76 GSBL üreten *E.coli* ile yaptıkları çalışmada izolatların %89.5'inde CTX-M, %59.2'sinde TEM, %11.8'inde SHV tipi GSBL olduğunu ortaya koymuşlardır. Biz de çalışmamızda GSBL üreten izolatların %86.8'ini CTX-M, %47.4'ünü TEM ve %9.2'sini SHV; sadece E.coli izolatlarını baz aldığımızda ise %87.5'ini CTX-M, %51.8'ini TEM, %5.4'ünü ise SHV olarak bulduk. Bu bulgular Görgeç ve arkadaşlarının bulduğu oranlarla çok benzerdir ve Türkiye'deki GSBL tiplerinin dağılımıyla ilgili fikir vermektedir. Buna göre CTX-M sıklığı hem Türkiye hem de dünyada ilk sırada olmakla birlikte, ikinci sırayı Türkiye'de TEM almaktadır.

Özellikle belirli CTX-M genotiplerinin coğrafik bölgelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. CTX-M-15 Hindistanda saptanan tek genotip olmasına rağmen tüm dünyada yaygın bir şekilde gözlenmektedir. Çünkü üropatojenik bir klon olan *E.coli* ST 131 tarafından taşınmaktadır (84). GSBL üreten üropatojenik *E.coli* ST 131 klonu 2000'li yıllardan itibaren Amerika (ilk olarak Kanada), Avrupa ve Afrika'da (özellikle Ortadoğu) CTX-M-15 tipi beta laktamaz üreten suşlarda görülmeye başlanmıştır (85). Bu klonun hızlı bir şekilde yayılmasında su veya gıdalar gibi çevresel etmenlerin yanı sıra ülkeler arasındaki seyahatlerin de önemli bir neden olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (86). Ülkemizde ise Gür ve arkadaşlarının (87) 2004 ve 2005 yıllarında *E.coli* izolatlarında yapmış oldukları GSBL gen taramalarında GSBL oranı %26 olarak ve CTX-M gen sıklığı ise %71.4 ile en yaygın GSBL olarak saptanmıştır. Nazik ve arkadaşları (88) *K.pneumoniae* izolatlarında

%85 oranında CTX-M saptamışlardır. Bayraktar ve arkadaşları (89) yakın zamanda yapmış oldukları çalışmada hastane ve toplum kökenli izolatlar arasında anlamlı bir fark olmayacak şekilde CTX-M gen prevalansını %92.5 ve %95.7 olarak yaygın bulmuşlardır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada ülkemiz ve dünya genelinde yayınlanan oranlara benzer şekilde CTX-M oranları %86.8 olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum özellikle tüm dünyada bahsi geçen CTX-M pandemisinden hastanemizin de etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür.

TEM grubu beta laktamazların 1963'de Temoneriae adlı hastadan izole edilmesinin ardından pek çok yeni türevleri ortaya çıkmıştır. TEM genleri genellikle farklı dağılım ve sıklık göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda TEM tipi GSBL'de konjuge olabilen epidemik plazmidler saptanmıştır. TEM tipi GSBL'nin bir üyesi olan TEM-24 ilk olarak *K.pneumoniae*'de 1988'li yıllarda tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda ise *E.coli*'ninde dahil olduğu çok çeşitli Enterobacteriaceae üyeleri, *Aeromonas spp*. ve *P.aeruginosa*'da saptanmıştır. Bu enzimin Avrupa'nın farklı ülkelerinde dağılımından sıklıkla *Enterobacter aerogenes* klonuna ait izolatların salgın ya da salgın dışı durumlarının fazlaca gözlenmesi sorumlu tutulmuştur. Belçika, Fransa, Portekiz ve İspanya'da TEM-24 yayılımı; 1990'dan bu yana Avrupa hastanelerinde çoğul ilaca dirençli *E.aerogenes*'de dahil olmak üzere diğer enterobakterilerde klonal yayılım şeklinde gözlenmiştir (90). Lavinge ve arkadaşlarının (91) Fransa'da yapmış oldukları bir çalışmada TEM-3 ve TEM-24 tipte GSBL geni pozitifliği %90 oranında baskın olup GSBL gen oranları %47.5 TEM-24, %42.5 TEM-3, %5 CTX-M-15, %2.5 CTX-M-3 ve %2.5 CTX-M-14 olarak saptanmıştır. GSBL üretim prevalansı *E.coli* için *E.aerogenes*'e göre oldukça düşük (%0.71/%17.9) bulunmuştur. Kore'de yapılan bir çalışmada TEM-52, *E.coli*'de yaygın bulunan TEM tipi beta laktamaz olarak saptanmıştır (92). Yapmış olduğumuz bu çalışmada TEM tipi beta laktamaz %47.4 oranında saptanmış olup bu pozitifliklerin çoğu (%77.2) CTX-M geni ile birliktedir.

SHV grubu beta laktamazlardan olan SHV-1 sıklıkla *K.pneumoniae*'nin kromozom yapısında bulunur. *E.coli*'de SHV gen taramaları genellikle düşük prevalanslı sonuçlanmıştır. Norveç'de 2003'de yapılmış bir çalışmada 19 *K.pneumoniae*'nin 15'inde, 50 *E.coli* izolatının ise sadece ikisinde SHV geni

saptanmıştır (93). İsviçre'de 60 izolatta yapılan SHV gen çalışmasında 7 *E.coli* izolatında SHV-2, SHV-2a, SHV-12 saptanmıştır (94). Ülkemizde ise Taşlı ve arkadaşlarının (95) Enterobacteriaceae ailesinde PZR-RFLP metodunu kullanarak yapmış oldukları çalışmada *Klebsiella* izolatlarında daha sık olmakla birlikte SHV-12, SHV-2 ve SHV-5 gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda sıklığı en az olan beta laktamaz %9,2 ile SHV olmuştur. Bu oran bizim çalışmaya dahil ettiğimiz suşların ağırlıklı olarak *E.coli* olması ve yaygın görülen bazı SHV tiplerinin *E.coli*'den çok *K.pneumoniae*'yı etkilemesi ile açıklanabilir.

Çalışmamız sadece tek bir hastane verillerini içermesi ve küçük çapta bir çalışma olması dolayısıyla birtakım eksikliklere sahiptir. Bu çalışmada AmpC'nin GSBL tespitini maskelemesinin önüne geçebilmek adına sefoksitin duyarlılığı kriteri kullanılmış, sefoksitin dirençli izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. AmpC tipi beta laktamaz varlığında GSBL negatif bir izolat için tarama testleriyle yanlış pozitiflik; ya da GSBL üreten bir izolatın doğrulama testlerinde yanlış negatiflik saptanmakta, bu da gereksiz işgücü, zaman ve maliyet kaybına neden olmaktadır. Bu kayıpların önüne geçebilmek için bu iki tip beta laktamazın ayrımını daha güvenli bir şekilde yapacak testlerle çalışmamızın geliştirilmesinin fayda getireceğine inanmaktayız. Çalışmamızda tarama ve doğrulama testleri için duyarlılıklar literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte özgüllükleri oldukça yüksek olarak saptanmıştır. Bunun nedeni GSBL negatif gruba sefalosporin grubu antibiyotik MİK'leri çok düşük olan izolatların dahil edilmiş olmasıdır. İlgili antibiyotiğin CLSI ya da EUCAST duyarlılık sınırına daha yakın MİK'lerle çalışılması, daha dengeli bir duyarlılık ve özgüllük sonucu sağlayacaktır. Biz çalışmamızda bütçe kısıtlılıklarından dolayı duyarlılık testlerini ve moleküler tiplendirmeyi GSBL tespiti üzerine yoğunlaştırmış olsak da günümüzde artık bu konunun karbapenem direncinden ayrı ele alınmaması gerektiğinin bilincindeyiz. Suş sayısının arttırılması ve çalışmanın devamının karbapenem direncini de saptayacak şekilde getirilmesiyle birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarının arada kaldığı bu günlerde bu karanlık noktaya ışık tutulabileceğini düşünmekteyiz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 76'sı GSBL üreten, 74'ü GSBL üretmeyen olmak üzere toplam 150 Enterobacteriaceae suşunun izole edildikleri bölümler, sefalosporin duyarlılıkları, CLSI ve EUCAST kriterlerine göre tarama ve doğrulama testlerinin duyarlılıkları ile özgüllükleri araştırılmıştır. Ayrıca sağlıklı bir duyarlılık ve özgüllük verisi elde edebilmek adına izolatların ürettikleri beta laktamazlar moleküler yöntemle saptanmış, TEM, SHV, CTX-M tipi enzimlerin araştırıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

1- GSBL üreten izolatların oranı yoğun bakımda en yüksekken, bunu dahiliye ve üroloji servisleri takip etmektedir.

2- Çalışmaya dahil edilen izolatlar *E.coli* ağırlıklı olmakla birlikte GSBL üretme oranı en fazla *K.pneumoniae*'da bulunmuştur.

3- GSBL üreten izolatların beta laktam duyarlılıkları CLSI kriterleriyle seftazidim için %29.2, sefepim için %14.5 aztreonam için %2.6; EUCAST kriterleriyle seftazidim için %19.7, sefepim için %15.8 aztreonam için %13.2 olarak bulunmuştur.

4- Çalışmamızda GSBL üreten izolatların %86.8'i CTX-M, %47.4'ü TEM ve %9.2'si SHV olarak bulunmuştur.

5- CTX-M beta laktamazı bulunduran izolatların tamamı seftriakson ve sefotaksime dirençli bulunmuştur.

6- Her iki kriterin birbirine anlamlı bir üstünlüğü olmamakla birlikte GSBL tarama testi için duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi disk EUCAST kriterlerine göre yorumlanan sefpodoksim diski olarak saptanmıştır. Bunu CLSI kriterleriyle yorumlanan sefpodoksim, ve her iki kriterin de benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdiği sefotaksim ve seftriakson diskleri izlemiştir.

7- EUCAST'in seftazidim ve sefotaksim için tarama ve doğrulama disk difüzyon testlerinde farklı içeriklerde diskler önermesinin özellikle seftazidimde

duyarlılık artışını sağlamakla birlikte pratikte kullanım zorluğuna sebep olacağını düşünmekteyiz.

8- Ülkemizde de dünyada olduğu gibi CTX-M tipi beta laktamazların çok yaygın olması sebebiyle tarama ve doğrulama testlerinde seftazidim ve seftazidimli kombinasyonların kullanılması yanlış negatifliklere yol açabilmektedir. Tarama testlerinde sefpodoksim, sefotaksim veya seftriakson; doğrulama testlerinde ise sefotaksimli kombinasyonların kullanılması daha doğru sonuç verilmesini sağlayacaktır.

9- Antibiyotik duyarlılık sonuçlarını MİK saptamadan veren laboratuvarların rutin olarak eş zamanlı doğrulama testlerini yapmaya devam etmesi, duyarlılık sınırdeğerleri içinde olsa da yüksek MİK'e sahip sefalosporinlerin tedavi başarısızlıklarının önüne geçebilmek açısından önem taşımaktadır.

10- Antibiyotik duyarlılık sonuçlarını MİK saptayarak veren laboratuvarların özellikle kritik hasta grubunda ve sadece tedavide kullanılması düşünülen sefalosporin MİK'i duyarlılık sınırdeğerine yakın izolatlar için ek doğrulama testleriyle GSBL üretimini araştırıp ilgili kliniği uyarmasının tedavi başarısı açısından faydalı olacağına inanmaktayız.

7.KAYNAKLAR

1- Töreci K. “Enterobacteriaceae Genel Özellikleri” İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002: 1555.

2- Donnenberg MS. “Enterobacteriaceae” İçinde: Mandell GL, Bannett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005: 2567-2587.

3- “Enterobacteriaceae” İçinde: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). Medical Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005: 323-338.

4- Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM. “Enterobacteriaceae: Introduction and Identification” İçinde: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2009: 649–669.

5- Farmer JJ, Farmer MK, Holmes B. “The Enterobacteriaceae: General Characteristics”. İçinde: Borriello SP, Murray RP, Funke G (eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology, 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2005: 1317-1360.

6- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543.

7- “The Enterobacteriaceae” İçinde: Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (eds). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 213.

8- Erdem B. “Enterobacteriaceae” İçinde: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999: 471-515.

9- Gür D. “Enterik Gram Negatif Çomaklar” İçinde: Brooks GF, Carrol CK, Butel JS, Morse SA (eds). Jawetz, Melnick, Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2010: 249-260.

10- Gür D. “Gram Negatif Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları”. İçinde: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (eds). Önemli ve Sorunlu Gram negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004: 69.

11- Bush K, Jakoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemoter 1995; 39: 1211-33.

12- Berkiten R. “Fakültatif Anaerop Gram-negatif Çomaklar” İçinde: Bozkaya E, ed. Tıbbi Mikrobiyoloji 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005: 51-98.

13- Willke Topçu A. “Aminoglikozidler”. İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 294–302.

14- Gülay Z. ESBL’lerin tanı yöntemleri. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; syf.13-26.

15- Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. Klimik Derg; 2001;14 (1): 47-55.

16- Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2008; 285-329.

17- Essack SY.The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolation of beta-lactameses, Pharmaceutical Resaearch 2001;18 (10):1391-1399.

18- Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria, Clin Infect Dis 1998;27(Suppl 1): 93-96.

19- Mederios AA. Cooperative evolution of mechanisms of ß-lactam resistance. Clin Microbiol Infect 2000; 6(Suppl 3):3-5.

20- Martine Martinez L, Conejo MC, Pascual A et al. Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli*

hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles, Antimicrob Agents Chemother 2000;44 (9):2534-36.

21- Poole K. Efflux mediated multiresistance in gram-negative bacteria Clin Microbiol İnfect 2004;10 (1):12-26.

22- Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2000:236- 52.

23- Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotic resistance, Clin Microbiol Infect 2000; 6(Suppl 3):93-4.

24- Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar, Flora 2001;6(Ek 1): 3-23.

25- 14. Mederios AA. Beta-lactamases. Br Med Bull 1984; 40 (1) :18-27.

26- Bush K, Jacoby G. Nomenclature of TEM β–lactamase, J Antimicrob Chemoter 1997; 39 (1):1-3.

27- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum βlactamases in Gram-negative rods. Infect Genet Evol, 2012;12(5):883-93.

28- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe, J Antimicrob Chemother 2007; 59(2):165-74.

29- Poirel L, Nordman P. Acquired carbapenem hydrolysing beta-lactamases and their genetic support, Curr Pharm Biotechnol 2002; 3 (2):117-27.

30- Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, Clin Microbiol Rev 2001; 14 (4):933-51.

31- Taşova Y. Gram negatif enterik bakteri enfeksiyonlarının yönetimi, ANKEM Derg 2011;25(Ek 2):34-44.

32- Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O ve ark. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa'* larda çeşitli antibiyotiklere direnç ve İBL yapımının araştırılması, Klimik Derg 2004; 17(1): 47-9.

33- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamaseproducing organisms, J Hosp Infect 2009;73(4):345-54.

34- Günseren F, Mamıkoğlu L, Öztürk S, et al. A surveilance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey, J Antimicrob Chemother 1999; 43 (4):373-78.

35. Livermore DM. Of pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001; 47 (3):247-50.

36- Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem- hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests, Journal of Clin Microbiol 2006:44(6): 1971-76.

37- Turner PJ, Extended-Spectrum b-Lactamase, Clin Infect Dis 2005; 41(Suppl 4):273-75.

38- Lavigne, J. P., H. Marchandin, J. Delmas, N. et al. qnrA in CTX-M producing *Escherichia coli* from France, Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (12):4224–228.

39- Saladin, M., V. T. Cao, T. Lambert, J. et al. Diversity of CTX-M - lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospital, FEMS Microbiol. Lett, 2002: 209(2):161–68.

40- Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. In: Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar; Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004:syf. 5-13.

41- Stürenburg E, Mack D. Extended spectrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control, Journal of Infect Dis 2003; 47(4): 279-59.

42- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, et al. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeuroginosa*, Antimicrobial Agents Chemother 2001; 45(9): 2615-620.

43- Ângela N, Rafael C, Teresa M, et al. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance, Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(7): 2377–82.

44- Bonnet R. Minireview: Growing group of extended-spectrum β-lactamases: The CTX-M enzymes, Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 (1):1-14.

45- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer betalactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10(4): 867-78.

46- Barroso H, Freitas VA, Lito LM. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extendedspectrum β-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 611-6.

47- Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol 2010; 48(12): 4417-25.

48- Tenover FC, Rajinder K, Williams PP. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis 2006; 12(8): 1209–13.

49- Jain S, Andrews J, Fraise A, Brenwald N. Rapid detection of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacilli in blood cultures. J Antimicrob Chemother 2007; 60(3): 652-4.

50- Réglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, et al: Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases, J Med Microbiol 2008; 57(3): 310-5.

51- Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, Clifton-Hadley F: Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains, J Antimicrob Chemother 2009;63(2):302-8.

52- Matthew M, Harris AM, Marshall MM, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88: 169-78.

53- Tham TN, Mabilat C, Courvalin P, Guesdon JL. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum ß-lactamases in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol Lett 1990; 69: 109-16.

54- Hoban DJ, Nicolle LE, Hawser S, Bouchillon S, Badal R. Antimicrobial suspectibility of global inpatient urinary tract isolates of *E.coli*: results from the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011;70(4):507-511.

55- Hsueh PR, Badal RE, Hawser SP, Hoban DJ, Bouchillon SK, Ni Y, Paterson DL. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). Int J Antimicrob Agents, 2010;36(5):408-414.

56- Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram negative pathogens. Korean J Intern Med, 2012;27(2):128-142.

57- Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve Klebsiella türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları. ANKEM, 2005; 19(2): 84-87.

58- Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretme ve Antibiyotik Direnç Oranları Klimik Dergisi, 2006; 19(6): 43-45.

59- Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. Fırat Tıp Derg, 2010;15(4): 197- 200.

60- Baykal A, Çöplu N, Şimşek H, Esen B, Gür D. Kan İzolatı *E.coli* ve *K.pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz, KPC-Tip Karbapenemaz ve Plazmid Aracılı AmpC BetaLaktamaz Varlığının Araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2012;46(2): 159-169.

61- Akyar I. Antibiotic resistance rates of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. strains isolated from urinary tract infections in a private hospital. Mikrobiyol Bul, 2008;42(4):713-715.

62- Sağlam D, Durmaz S, Kılıç H, Atalay MA, Erçal BD, Şarli Ş, Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklıgı ve antibiyotik direnç paternleri. ANKEM Derg 2011; 25: 250-255.

63- Villegas MV, Correa A, Perez F et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum betalactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals, Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49(3):217-22.

64- Andes D, Craig WA. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Clin Microbiol Infect 2005; 11 Suppl 6: 10–7.

65- Maglio D, Ong C, Banevicius MA et al. Determination of the in vivo pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum-blactamase-producing *Escherichia coli* at various inocula. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1941–7.

66- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum b-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2001; 39: 2206–12.

67- Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? J Antimicrob Chemother 2012;67:1569-77.

68- Wang P, Hu F, Xiong Z, et al. Susceptibility of extended-spectrum-beta-lactamaseproducing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. J Clin Microbiol 2011; 49:3127–31.

69- Song W, Park MJ, Kim HS, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints for beta-lactams in Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases and/or plasmid-mediated AmpC beta-lacta. Korean J Clin Microbiol 2011;14:24-9.

70- Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, Tsakris A. 2014. Modified CLSI extended-spectrum β-lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among Enterobacteriaceae producing various β-lactamases. J Clin Microbiol 52:1483–1489.

71- Thsk, Kullanılan Standartlar ve Farkları (CLSI, EUCAST). Erişim: http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/uamdss/02-AMD-TB-02-CLSI-EUCAST-Farklari.pdf.

72- Blandino G, Mastrojeni S, Inturri R, Sciacca A, Nicoletti G. Antimicrobial susceptibility of strains of Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections using current CLSI and EUCAST breakpoints. Health 2014; 6(2): 153-7.

73- Rodriguez-Bano J, Picon E, Navarro MD, Lopez-Cerero L, Pascual A; ESBL-REIPI Group. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli. Clin Microbiol Infect 2012; 18(9): 894-900.

74- Hombach M, Mouttet B, Bloemberg GV. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC β-lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. J Antimicrob Chemother 2013; 68(9): 2092-8.

75- Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Hombach M. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β-lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. J Antimicrob Chemother 2012; 67(1): 159-66.

76- Paul M, Shani V, Muchtar E et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4851–63.

77- Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 913–20.

78- Wiegand I,Geiss HK, Mack D,et al.(2007): Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. J Clin Microbiol ;45:1167-74.

79- Sullivan R, Schaus D, John M, Delport JA (2015) Extended Spectrum Beta- Lactamases: A Minireview of Clinical Relevant Groups. J Med Microb Diagn 4: 203. doi:10.4172/2161-0703.1000203.

80- Mangaiyarkarasi T, Pragash Dhandapany Senthil, Ragunathan Latha, Baskaran K, Hemalatha G, Rayapu Vijaya, Shaker Ivvala Anand. Comparison of double disc synergy test and phenotypic confirmatory disc diffusion test for detection of ESBL production and their antimicrobial resistance pattern. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2013 Apr-June; 4(2): 35-39.

81- De Gheldre Y, Avesani V, Berhin C, Delmee M, Glupczynski Y (2003) Evaluation of oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 52:591–597.

82- Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard J-L, Jarlier V, Robert J (2011) Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 49: 1048–1057.

83- Görgeç S, Kuzucu Ç, Otlu B, Yetkin F, Ersoy Y: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten nozokomiyal *Escherichia coli* izolatlarında beta-laktamaz gen oranları ve klonal ilişkinin araştırılması.Mikrobiyol Bul 2015; 49(1): 15-25.

84- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother, 2009; 64 (1):3–10.

85- Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* 025b-ST131:a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J Antimicrob Chemother 2011;66(1):1-14.

86- Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J. Human associated extended-spectrum beta lactamase in the Antartic. Appl Environ Microbiol, 2012;78(6):2056-2058.

87- Gür D, Gülay Z, Akan OA,ve ark. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4):537-44.

88- Nazik H, Öngen B, Sarıkaya A, Kuvat N, İlktaç M. Genişlemiş Spektrumlu BetaLaktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Ko-rezistansı. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4):537-44.

89- Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Detection of bla(CTX-M) beta-lactamase genes in extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacteria. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 187-96.

90- Novais A, Baquero F, Machado E, et al. International spread persistence of TEM- 24 is caused by the confluence of highly penetrating Enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696: Tn1 and IS5075-Tn-21. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 825-34.

91- Lavigne JP, Bouziges N, Chanal C, et al. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3805-8.

92- Pai H, Lyu S, Lee JH, et al. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1758-63.

93- Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, et al. Norwegian ESBL Study Group. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum-betalactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. Clin Microbiol 2007; 45(1):199-205.

94- Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(5): 943-9.

95- Taşlı H, Bahar H. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 162-7.