T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTERİK BAKTERİLERDE PLAZMİDLE KODLANAN TEM ve SHV-TİPİ BETA-LAKTAMAZ GENLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

DOKTORA TEZİ

Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

HAZİRAN 2001

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTERİK BAKTERİLERDE PLAZMİDLE KODLANAN TEM ve SHV-TİPİ BETA-LAKTAMAZ GENLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.01.2001

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :26.06.2001

Tez Danışmanı : Doç Dr. Ali Osman KILIÇ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Murat ERTÜRK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Nuri KALYONCU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç Dr. Neşe KAKLIKKAYA

Enstitü Müdürü Doç Dr. Abdülkadir REİS

HAZİRAN 2001
TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince önemli sorumluluklar ve görevler içinde olsa dahi bıkmadan, eksiksizce engin bilgi ve tecrübeleriyle danışmanlığımı yaparak, bilimsel felsefe ve disiplini öğreten değerli hocam Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a şükran ve saygılarımı sunmayı zevkli bir görev sayarım.

Çalışmam süresince ilgisini, yardımını ve bilgisini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN' a teşekkürlerimi borç bilirim.

Saygıdeğer arkadaşım Yrd. Doç Dr. Neşe KAKLIKKAYA' ya destek ve yardımlarından dolayı teşekkür eder, öğretim üyeliği görevinde üstün başarılar dilerim.

Tezimi hazırladığım ve çalıştığım süre içinde arkadaşlık ve desteklerini eksik etmeyen bölüm arkadaşlarım Dr. İlknur TOSUN, Dr. Kıvanç ÇUBUKÇU, Vet. Hek. C. Kurtuluş BURUK, Dr. Serpil YETİŞKUL, Dr. Yelda YAZICI ve Dr. Metin SANCAKTAR'a teşekkür eder, eğitim hayatları ve gelecek görevlerinde başarılar dilerim.

Ayrıca, tezimde gerekli olan bazı suşların temininde yardımlarını esirgemeyen KTÜ, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. İftihar KÖKSAL'a ve Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç Dr. Metin OTKUN'a müteşekkir olduğumu belirtmek isterim.

Tez çalışmamı Yard. Doç. Dr. Faruk AYDIN yönetimindeki 20.114.001.10 kodlu proje ile destekleyen K.T.Ü. rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca sabır ve anlayışıyla her zaman bana destek olan anneme, babama, eşime ve biricik kızıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ß-Laktam Antibiyotikler	3
2.1.1. Yapı ve Sınıflandırılmaları	3
2.1.2. ß-Laktamların Etki Mekanizmaları	8
2.2. ß-laktam Direnci	9
2.2.1. ß-Laktamaz Enzimleri	9
2.2.1.1. ß-Laktamaz Enzimlerinin Sınıflandırılması	9
2.2.1.2. Enterobakterilerde Kromozom Orijinli ß-Laktamazlar	11
2.2.1.3. Enterobakterilerde Plazmid Orijinli ß-Laktamazlar	13
2.2.1.3.1. Plazmidle Kodlanan ß-Laktamazların Sınıflandırılması	15
2.2.2. Enterobakterilerde ß-Laktamaz Genlerinin Yayılım Yolları	19
2.2.2.1. Bakteriyel Konjugasyon	20
2.2.2.2. Konjugatif Transpozisyon	23
2.3. Klinik Antibiyotik Kullanımı ile β-Laktamaz Evolüsyonu Arasındaki İlişki	23
3. MATERYAL ve METOD	26
3.1. MATERYAL	26
3.1.1. Klinik Bakteri Suşları	26
3.1.2. Laboratuar Suşları, Standart Suşlar ve Plazmidler	29

3.1.3. Gereçler, Besiyerleri ve Kimyasallar 30
3.1.3.1. Gereçler 30
3.1.3.2. Besiyerleri ve Kimyasallar 30
3.1.4. Besiyerleri ve Ayıraçlar 31
3.1.5. Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar 32
3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi için Solüsyonlar 33
3.1.7. Southern Blot Hibridizasyonunda Kullanılan Solüsyonlar 33
3.2. METOD 36
3.2.1. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları 36
3.2.2. Ampisiline Dirençli Enterobakterilerin Seçilmesi ve Saklanması 39
3.2.3. Enterobakterilerin ve Transkonjugantlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Testlerinin Yapılması 39
3.2.4. Çift Disk Sinerji (ÇDS) Testi ile GSBL Tayini 41
3.2.5. Konjugasyon ile Plazmid DNA Transferi 41
3.2.6. Plazmid DNA İzolasyonu 43
3.2.7. Plazmid DNA'larının *Eco*RI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi 44
3.2.8. Agaroz Jel Elektroforezi 44
3.2.9. Plazmid DNA'larının Moleküler Büyüklüklerinin Hesaplanması 45
3.2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile β-Laktamaz Genlerinin Tiplendirilmesi 46
3.2.11. bla_{TEM} ve bla_{SHV} –Spesifik Probların *Eco*RI ile Kesilmiş Plazmid DNA'ları ile Hibridizasyonu 47

4. BULGULAR 50
4.1. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Tür Tayinleri 50
4.2. Ampisilin Dirençli (Amp^r) *Enterobacteriaceae* İzolatları 51
4.3. Ampisilin Direncinin Konjugatif Transferi 52
4.4. Epidemik ve Nonepidemik Plazmidlerin Belirlenmesi ve Gruplandırılması 54
4.5. Çift Disk Sinerji Testi 60

4.6. Transkonjugantlarda TEM- ve SHV-Tip β-Laktamaz Genlerinin PCR ile Belirlenmesi 63
4.7. Plazmidlerin *Eco*RI Fragmanlarının bla_{TEM} ve bla_{SHV} Probları ile Hibridizasyonu 65
4.8. Enterobakteriler ve Transkonjugantlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Test Sonuçları 72

5. TARTIŞMA 86
6.SONUÇ ve ÖNERİLER 98
7. ÖZET 103
8. SUMMARY 104
9. KAYNAKLAR 105

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. β-Laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması 4

Tablo 2. Sefalosporinlerin Kuşaklarına Göre Sınıflandırılması 6

Tablo 3. Ambler'in β-Laktamaz Sınıflandırması ile Bush'un Fonksiyonel Grupları Arasındaki Benzerlik 10

Tablo 4. Plazmid Aracılı β-Laktamazların Dağılımı 14

Tablo 5. İzole Edilen Ampisiline Dirençli *Enterobacteriaceae* Türleri 27

Tablo 6. İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Türlerinin Dağılımı 50

Tablo 7. Ampisilin Direncinin Türlere Göre Dağılımı 51

Tablo 8. Verici Suşların Konjugasyon Etkinlikleri ve Transkonjugantları 53

Tablo 9. Plazmidlerin Moleküler Büyüklükleri ve Gruplandırılması 58

Tablo 10. Konjugatif Plazmidleri Taşıyan Suşların İzole Edildiği Materyaller ve Sağlandığı Hastane Üniteleri 59

Tablo 11. Epidemik ve Nonepidemik Konjugatif Plazmid Gruplarının Hastane Ünitelerine Dağılımı 60

Tablo 12. Verici Suşlar ve Transkonjugantlarının ÇDS Test Sonuçları 62

Tablo 13. Epidemik ve Nonepidemik Plazmid Gruplarında TEM veya SHV Türevi β-Laktamaz Dağılımı 64

Tablo 14. GSBL Üreten Suşlarda TEM ve SHV-Tipi Genlerin Dağılımı 65

Tablo 15. *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ Problarının Hibridize Olduğu Plazmidlerin *Eco*RI Restriksiyon Fragmanları 66

Tablo 16. A Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 73

Tablo 17. B Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 75

Tablo 18. C Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 77

Tablo 19. D Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 79

Tablo 20. E Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 81

Tablo 21. F, G, H, I, J, K, L ve M Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antibiyotik Hassasiyet Testleri 83

Tablo 22. GSBL Üreten Enterobakterilerin Antibiyotiklere Direnç Oranı 85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. β-Laktam Halkası 3

Şekil 2. 6-aminopenisilonik Asitin Yapısı 4

Şekil 3. 7-amino Sefalosporinik Asitin Yapısı 5

Şekil 4. Karbapenemin Yapısı 7

Şekil 5. Monobaktamın Yapısı 7

Şekil 6. Klavulanik Asitin Yapısı 8

Şekil 7. A Sınıfı β-Laktamazın Tersiyer Yapısı 11

Şekil 8. TEM ve SHV β-Laktamazlarda Genişlemiş Spektrumlu Mutasyonların Rölatif Yerleşimleri 18

Şekil 9. Klinik Suşlardan İzole Edilmiş Plazmidler 55

Şekil 10. Transkonjugantlardan İzole Edilmiş Plazmid DNA'ları 56

Şekil 11. Transkonjugantlardan İzole Edilmiş Plazmidlerin *Eco*RI Kesimleri 57

Şekil 12. GSBL Üreten *E. coli* TRE090'nın ÇDS Testi. 61

Şekil 13. bla_{TEM} ve bla_{SHV} Genlerinin PCR Analizi 63

Şekil 14. bla_{TEM} Probunun A, B1, B2, C1, C2 ve L Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu 68

Şekil 15. bla_{TEM} Probunun D, J, G, E, H, I, F ve K Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu 69

Şekil 16. bla_{SHV} Probunun A, B1, B2, C1, C2 ve L Grubu Plazmidlerile Hibridizasyonu 70

Şekil 17. bla_{SHV} Probunun D, J, G, E, H, I, F ve K Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu 71

1. GİRİŞ ve AMAÇ

β-laktam antibiyotiklere bakteriyel direncin en genel mekanizması β-laktamaz üretimidir. β-laktamaz enzimi antibiyotiğin β-laktam halkasındaki amid bağını parçalar ve bakteriye zarar vermesini engeller. β-laktamaz kodlayan genler kromozom veya plazmid üzerinde bulunur. Bu genlerin plazmidlerde ve transpozisyon yapabilen elemanlarda bulunması, konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyonla uzak akraba türlere bile transfer edilebilmesine olanak verir. $bla_{\text{TEM-1}}$ tarafından kodlanan TEM-1 ve bla_{SHV} tarafından kodlanan SHV β-laktamazlar A sınıfı enzimlerdir. Epidemiolojik çalışmalar TEM-1'in gram negatif bakterilerde en sık görülen plazmid aracılı enzim olduğunu göstermektedir. A sınıfı β-laktamaz olan SHV, TEM β-laktamaza % 68 oranında homoloji göstermektedir. Bu enzimler dar spektrumlu olup penisilin ve bazı sefalosporinleri hidroliz ederler (1).

Oksiimino-ß-laktamların kliniğe girmesinden hemen sonra *Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)*, *Escherichia coli* (*E. coli)* ve az sayıdaki diğer türler bu yeni ajanlara direnç geliştirerek, çoklu antibiyotik direnç genleri içeren konjugatif plazmidleri vasıtasıyla diğer bakterilere yaymaya başlamışlardır (2). Bu izolatların ürettiği geniş spektrumlu enzimlerin aktif bölgelerine yakın yerlerinde bir veya daha fazla amino asidin değişmesiyle (substitution) TEM- ve SHV- türevleri veya varyantları denilen genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar (GSBL) oluşmaktadır. Böylece oksiimino-substratlar için enzimin afinitesi ve hidrolitik yeteneği artmaktadır (3).

GSBL'ler ilk olarak 1983'te Avrupa'da tarif edilmişlerdir ve dünyanın her yerinden oldukça sık olarak rapor edilmektedirler (2, 4-13). GSBL kodlayan plazmidler genelde büyük moleküler ağırlıktadır ve farklı birçok antibiyotik direnç genleri taşırlar (2). β-laktamaz genleri taşıyan plazmidler IncF veya IncP *incompatibility* grubunda olup, konjugasyonla başka bir bakteriye aktarılırken, üzerinde taşıdıkları aminoglikozid, tetrasiklin ve sulfonamid gibi direnç genlerini de beraberinde transfer ettikleri bilinmektedir (14, 15).

B-laktamaz kodlayan konjugatif plazmid taşıyan suşların hastanelerde salgınlara yol açtığı bilinmektedir. Bir hastanede birçok GSBL üreten suş görülmekle birlikte, genellikle tek tip dominanttır. Bazı hastanelerde GSBL kodlayan plazmidler farklı suşlarca yayılabilir fakat, bütün hastalardan aynı konjugatif plazmidi içeren bakterilerin izole edildiği salgınlar da sıklıkla meydana gelebilmektedir (3). Bu varyantların ortaya çıkması ve yayılmasının, yeni β-laktamların kullanıma girmesinden kaynaklandığı birçok çalışmada bildirilmektedir (16, 17).

National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) GSBL üreten bakterilerin fenotipik olarak penisilinler ve sefalosporinlere hassas olsalar bile, dirençli olarak rapor edilmesini öngörmektedir (14).

Bu çalışmada K.T.Ü. Farabi Hastane'sinde yatan hastalardan ve polikliniklere başvuran hastalardan 2 ay boyunca elde edilen klinik materyallerden izole edilmiş *Enterobacteriaceae* familyası bakterilerde TEM ve SHV-tipi β-laktamaz kodlayan plazmidlerin moleküler tiplendirilmeleri ve tiplerin prevalansı ile konjugal transfer olabilen direnç genlerinin araştırılması amaçlandı.

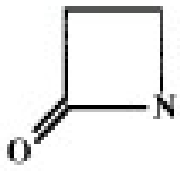
2. GENEL BİLGİLER

2.1. ß-Laktam Antibiyotikler

Molekülünün antibakteriyel etkinlikten sorumlu çekirdek kısmında ß-laktam halkası içeren antibiyotiklere ß-laktam antibiyotikler veya ß-laktamlar adı verilir (18).

2.1.1. Yapı ve Sınıflandırılmaları

ß-laktam halkası biri azot, üçü karbon olan 4 üyeli doymuş heterosiklik bir halkadır (Şekil 1).



Şekil 1. ß-Laktam Halkası

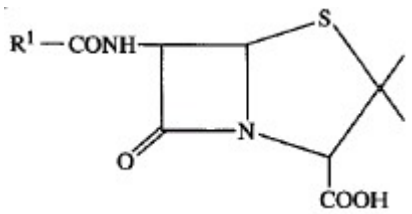
Klinik olarak önemli ß-laktamların büyük bölümü penisilin (penam) ve sefalosporin (sefem) gruplarına dahildir. Ayrıca, bu grup karbapenemler (örneğin; imipenem), monobaktamlar (örneğin; aztreonam) ve ß-laktamaz inhibitörlerini de (örneğin; klavulonat) içerirler (Tablo 1). Bunlardan monobaktamlar hariç diğerlerinde molekülün çekirdeği bi-siklik yapı gösterir ve ß-laktam halkası, beş veya altı üyeli ikinci bir halka ile füzyon yapmıştır. İkinci halka karbapenemler hariç heterosikliktir. Monobaktamlarda ß-laktam halkası tek başına bulunur.

Karbapenemler ve monobaktamlar yeni geliştirilen ß-laktamlardır. Klavam türevi olan ß-laktamaz inhibitörlerinin antibakteriyel etkinliği çok zayıftır veya hiç yoktur. Genellikle uygun bir ß-laktamla kombine kullanılırlar (18).

Tablo 1. ß-laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması (18)

I. PENİSİLİNLER (PENAMLAR)
II. SEFALOSPORİNLER (SEFEPEMLER vb.)
III. KARBEPENEMLER
IV. MONOBAKTAMLAR
V. ß-LAKTAMAZ İNHİBİTÖRLERİ (KLAVAMLAR vb.)

a. Penisilinler: Güçlü bakterisit etkileri yanında toksisiteleri düşük olan ve sık kullanılan doğal veya yarı sentetik antibiyotiklerdir. Penisilin adı, *Penicillum* spp.'lerinin antibakteriyel etkisini ilk kez gösteren Fleming tarafından 1929'da verilmiştir. Bütün penisilinlerde temel yapı 6-aminopenisilonik asid olan 6-APA'dır (Şekil 2). Penisilinler serbest karboksil grubu içerdiklerinden dolayı asidik bileşiklerdir. Çeşitli yarı sentetik penisilinler ß-laktam halkasının amino grubuna, amid oluşturacak şekilde asidik radikallerin takılması sonucu oluşmuşlardır. Penisilinler esas olarak ß-laktam halkasının amino grubu üzerindeki yan zincirin türüne göre yedi gruba ayrılırlar (18):



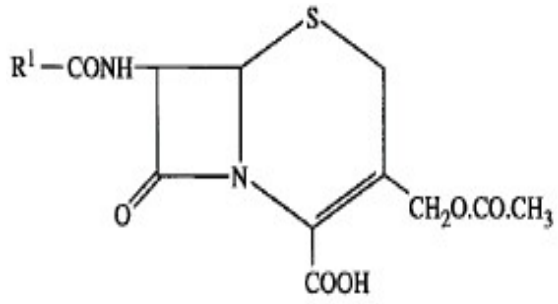
Şekil 2. 6-aminopenisilonik Asitin Yapısı

i) Benzilpenisilin: Penisilin G

ii) Fenoksipenisilinler: Penisilin V

iii) ß-laktamazlara dayanıklı penisilinler: Metisilin, nafsilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin ve floksasilin.
iv) Amino penisilinler: Ampisilin ve amoksisilin.
v) Karboksipenisilinler: Karbenisilin, tikarsilin ve karindasilin.
vi) Asilüreidopenisilinler: Mezlosilin, piperasilin ve azlosilin.
vii) Diğer penisilinler: Aminidopenisilinlerden mesilinam ve temosilin.

b. Sefalosporinler: Kimyasal yapıları, antibakteriyel etki mekanizmaları ve spektrumları bakımından penisilinlere benzerler. Onlar gibi ß-laktam türevleridir. Az sayıdaki bazı üyeler gerçekte sefalosporin yapısında olmayıp, sefamisin ya da oksasefem türevidirler. Sefalosporinlerin ana çekirdeğini sefem türevi olan 7-aminosefalosporanik asid (7-ASA) oluşturur (Şekil 3).



Şekil 3. 7-amino Sefalosporinik Asitin Yapısı

Bu madde *Cephalosporium acremonium* türü bir mantarın kültürlerinde oluşan bir fermantasyon ürünü olan sefalosporin C'den elde edilir. İlaç olarak kullanılan sefalosporinler, 7-ASA'dan türetilen yarı sentetik ilaçlardır. 7-ASA çekirdeğinde ß-laktam halkası, penisilinlerdeki tiazolidin halkası ile değil altılı bir halka olan dihidrotiazin halkası ile kondanse olmuştur. Bu özellik, ß-laktam halkasının bazı bakterilerin ürettiği gerçek penisilinazlar dahil ß-laktamaz enzimlerinin çoğuna karşı dayanıklı olmasını sağlar. Fakat sefalosporinazları içeren sınıf I veya diğer adlarıyla grup I ß-laktamazlar tarafından yıkılırlar. Sefalosporinler kronolojik esasa dayanan ve antibakteriyel spektrumdaki gelişmeyi yansıtması yönünden pratik

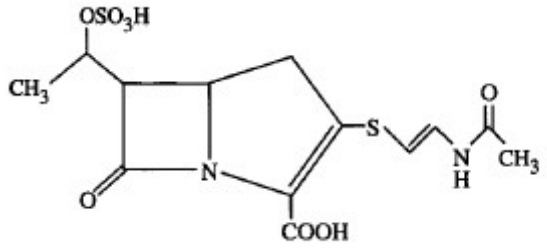
değeri olan bir sınıflandırma şekline göre dört kuşak halinde sınıflandırılırlar (Tablo 2).

Tablo 2. Sefalosporinlerin Kuşaklarına Göre Sınıflandırılması (18)

I. Kuşak Sefalosporinler	III. Kuşak Sefalosporinler
Sefaleksin	Seftazidim
Sefadroksil	Sefoperazon
Sefalotin	Sefsulodin
Sefazolin	Sefotaksim
Sefasetril	Seftizoksim
Sefradin	Seftriakson
Sefapirin	Moksalaktam
Sefaloglisin	Sefprozil
II. Kuşak Sefalosporinler	Sefpirom
Sefaklor	Sefmenoksim
Sefuroksim	Sefodizim
Seftibuten	Sefpodoksim
Sefprozil	**IV. Kuşak Sefalosporinler**
Sefiksim	Sefepim
Lorakarbef	
Sefoksitin	
Sefamandol	
Sefotetan	
Sefonisid	
Sefmetazol	
Sefotiam	
Sefetamet	

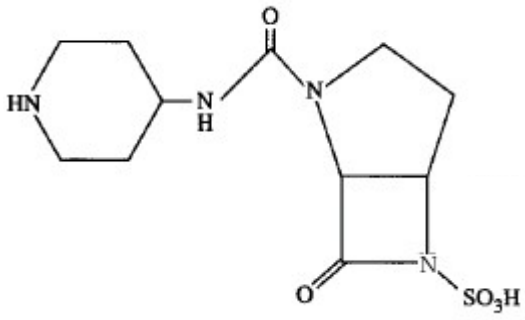
c. Karbapenemler: Yeni geliştirilen ß-laktamlar olan imipenem ve meropenemdir. Penisilin ve sefalosporinlerde olduğu gibi molekülde başka bir halka ile füzyon yapmış ß-laktam halkası bulunur, bunlarda da iki halkalı (bi-siklik)

bir çekirdek bulunur (Şekil 4). Kromozomsal ve plazmid orijinli ß-laktamazlara ileri derece dayanıklıdırlar (18).



Şekil 4. Karbapenemin Yapısı.

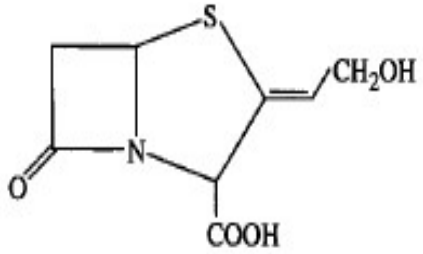
d. Monobaktamlar: Bu gruptaki aztreonam tamamiyle sentetiktir. Molekülündeki yan zincirler bakımından üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftazidime benzer (Şekil 5). Bu yan zincirler nedeniyle onun gibi gram negatif bakterilerin ürettiği ß-laktamazların çoğuna karşı ileri derecede dayanıklıdır. Böylece aerobik gram negatif bakterilere karşı etkinliği güçlendirilmiştir (18).



Şekil 5. Monobaktamın Yapısı.

e. ß-Laktamaz İnhibitörleri: ß-laktamazları irreversibl inhibe eden ve bakteri çeperindeki penisilin bağlayan proteinlere dokunmayan maddelerdir. Bunlar klavulanik asid (Şekil 6), sulbaktam ve tazobaktamdır. Bu maddeler ß-laktamazların "intihar ettiren inhibitör" (suicidal inhibitör) tipi irreversibl inhibitörüdürler. Önce ß-laktamazlar tarafından ufak molekül parçalarına ayrılırlar. Bunlardan biri enzimi irreversibl olarak inaktive eder (enzimin intiharına yol açar). Ancak az sayıda ß-

laktamaz türü bu maddelere dayanıklıdır. Amoksisilin/klavulanat, tikarsilin/klavulanat, ampisilin/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam inhibitörlerin penisilinlerle olan kombinasyonlarıdır (18).



Şekil 6. Klavulanik Asidin Yapısı.

2.1.2. ß-Laktamların Etki Mekanizmaları:

ß-laktam antibiyotikler bakteriyel hücre duvar sentezini inhibe ederler. Bakteriler ökaryotlardakine benzer bir sitoplazmik membrana sahiptirler. Özellikle gram-negatif bakterilerde bu membranı saran bir periplazmik boşluk ve takiben peptidoglikan tabakası bulunur. En dışta ise dış (outer) membran yer almaktadır. Peptidoglikan tabakası N-asetil-glukuronik asit (NAG) ve N-asetil muramikasit (NAMA) moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla oluşmuş bir polimerdir. Ağsı bir yapı gösterir. Çapraz bağlanma NAMA artıklarına bağlı D-alanil-D-alanin peptidleri arasında köprü kuran bir glisin pentapeptidle sağlanır. Güçlü hipotonik ortamda bakteriye sağlam (rigid) bir yapı vererek canlı kalabilmesini sağlar. Bakteriyel sitoplazmik ozmolalite 5-20 atm arasındadır.

Çapraz bağlanma reaksiyonu hücre membranında bulunan peptidoglikan transpeptidazlar ve karboksipeptidazlar tarafından katalizlenir. ß-laktam antibiyotiklerin ß-laktam halkası D-alanil-D-alanin konfigürasyonuna yakın benzerlik gösterdiğinden dolayı, transpeptidazlar için substrat görevi yapar. Enzimin açilasyonu geri dönüşümsüzdür. Bu yüzden peptidoglikan transpeptidazları penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak bilinmektedir. Bunların çeşitli tipleri olan PBP 1a ve 1b, PBP 2 ve PBP 3, bakteriyel hücre çeperinin sırasıyla uzamasını, belirli bir şekle girmesini ve ara bölmelerin oluşmasını sağlar.

E. coli'den elde edilen üç PBP tipi (PBP 4, 5 ve 6) daha vardır. Bunlar penisilinlerin etkisi bakımından önemli değildirler. Penisilinler genellikle PBP 1 ve PBP 3'e bağlanırlar. Penisilinlere duyarlı bakterilerde otolizinler veya murein hidrolazlar denilen litik enzimler bulunur. Penisilinler ve sefalosporinler doğal otolizin inhibitörlerini bloke etmek suretiyle otolizinlerin etkinliğini artırırlar ve hücrenin lizise uğramasında rol oynarlar. (18, 19).

2.2. ß-Laktam Direnci:

Bakteriler başlıca 3 mekanizma ile penisilinlere direnç kazanmaktadır (18, 20):

i) Periplazmik aralıkta yerleşmiş olan veya buradan hücre dışına salgılanan ß-laktamaz enzimleri tarafından penisilinlerin inaktivasyonu.
ii) Transpeptidazların ve bakteri çeperindeki diğer penisilin bağlayan proteinlerin ilaca karşı afinitesinin azalması.
iii) Hücre çeperinin permeabilitesinin azalması sonucu ilacın dışarıdan bakteri çeperindeki periplazmik aralığa girmesinin zorlaşması.

2.2.1. ß-Laktamaz Enzimleri

ß-laktam antibiyotiklere bakterilerin direncinin en sık sebebi ß-laktamazlardır. Direncin yayılması, benzilpenisilinlerin stafilokoklara karşı kullanımını sınırlamış ve enterobakteriler, *Haemophilu*s ve *Neisseria* türlerine karşı ampisilini kullanılmaz hale getirmişlerdir. Yeni ve eski enzimlerin türevleri günümüzde enterobakterilere karşı kullanılan geniş spektrumlu sefalosporinlerin değerini tehtid etmektedir (21).

2.2.1.1. ß-Laktamaz Enzimlerinin Sınıflandırılması:

Son zamanlara kadar, ß-laktamazlar hidrolitik spektrumlarına, inhibitörlere karşı hassasiyetlerine ve kromozomal veya plazmid aracılı olup olmadıklarına göre sınıflandırılmışlardır. Bin dokuz yüz yetmişlerde sefaloridinin benzilpenisilinden

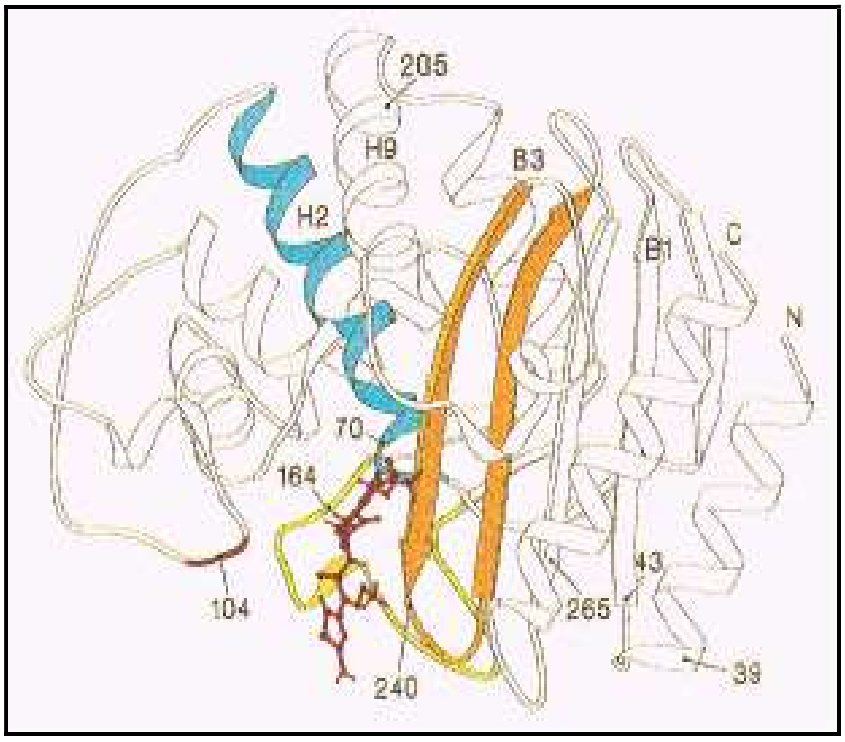
daha hızlı hidroliz edilmesi ve kloksasilin, klavulanat, aztreonam veya *p*-merküribenzoat ile enzimin inaktivasyonu sınıflama kriterlerleriydi. On beş yıl içinde bir çok eksiklik görüldü ve 1989 yılında Bush tarafından düzenlemeler yapılarak 1995'te plazmidle kodlanan β-laktamaz sınıflaması güncelleştirildi. Bu sınıflandırmada penisilin, oksasilin, karbenisilin, sefaloridin, geniş spektrumlu sefalosporinler ve imipenemin substrat olarak kullanılması ve bunların klavulanik aside hassasiyetleri sınıflandırma kriterleriydi. Buraya kadar olan sınıflandırmalar fenotipik sınıflandırmadır. Fenotipik sınıflandırma, nokta mutasyonlarının substrat aralığını değiştirmesi yüzünden karışıklıklara yol açmaktadır. Bu yüzden ilk olarak Ambler tarafından sekanslarına göre basit ve kullanışlı bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler A ile D arasında 4 sınıfa ayrılmışlardır. A, C ve D sınıfları evrimsel olarak ayrı olan serin enzimleridir. B sınıfı enzimler ise çinko tiplerini içerir (Tablo 3) (21, 22, 23).

Tablo 3. Ambler'in ß-Laktamaz Sınıflandırması ile Bush'un Fonksiyonel Grupları Arasındaki Benzerlik (21)

A[a]	B[b]	Aktivite[d]							Klavulanat ile İnhibisyon
		Pen	Carb	Oxa	Ceph	Ctx	Azt	Imp	
Serin ß-Laktamazlar									
A	2a	+++	+	-	±	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
	2br	+++	+	+	+	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	+
C	1	++	±	İnhibitör	+++	+	İnhibitör	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	±
Belirlenmemiş[c]	4[c]	++	++	++	V	V	-	-	-
Çinko ß-Laktamazlar									
B	3	++	++	++	++	++	-	++	-

Pen; penisilin, Carb; karbenisilin, Oxa; oksasilin, Ceph; sefaloridin, Ctx; sefotaksim, Azt; aztreonam, Imp; imipenem. [a]; Ambler'in yapısal sınıflandırması, [b]; Bush'un fonksiyonel grubu, [c]; Bush grubunun 4 enziminden hiçbiri halen sekans edilmemiştir, karbapenemaz aktivitesi olmadığından dolayı serin tipi olarak varsayılır, [d]; +++; tercih edilen substrat, ++; iyi substrat, +; hidroliz edilir, ±; zayıf hidroliz edilir, -; stabil, V; grup içinde değişken, ?; kesin değil.

Bütün Gram negatif bakteriler kromozomal, bir kısmı daplazmid aracılı ß-laktamaz üretirler (24). Kromozosal veya plazmid aracılı olan A sınıfı ß-laktamazlar genelde alfa-helikal bir domain ve alfa-helikslerle çevrilmiş beş antiparalel ß-yaprağına (sheet) sahiptir. Enzim aktivitesi için reaktif olan Serin-70 (mavi heliks) alfa-heliks H2'nin amino ucundadır (Şekil 7).



Şekil 7. A sınıfı ß-Laktamazın Tersiyer Yapısı (25).

2.2.1.2. Enterobakterilerde Kromozom Orijinli ß-Laktamazlar

Kromozomal ß-laktamazlar, *Salmonella* hariç bütün enterobakterilerde kendine hastırlar. Fakat miktarında, üretim şeklinde ve sonuçta direnç oluşumuna katkılarında değişiklikler gösterirler. Bazı türler tipik olarak A sınıfı enzimlere sahiptir. Fakat C sınıfına sahip olanlar daha çoktur. Enzim üretimi tür ve suşa göre indüklenebilir, yüksek düzeyde konstitütif veya düşük düzeyde konstitütif olabilir.

E. coli ve *Shigella* genelde AmpC tip olarak bilinen indüklenemeyen enzimlere sahiptirler. Bunlar doğal olarak ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlerden sefalotin ve sefaleksine hassastırlar. Direnç, sadece PBP'lere zayıf bağlanan

izoksazolil penisilin, benzilpenisilin ve sefsulodine karşı olur. Diğer ß-laktamlara direnç sekonder ß-laktamazlara sahip olunursa ortaya çıkar. Geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç orta düzeydedir. Karbapenemler bu enzime dayanıklıdır. Klavulanat AmpC tip enzim aktivitesini inhibe etmez.

Enterobacter spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* ve *Proteus rettgeri E. coli*'ninkine benzer AmpC tip enzim üretirler. *E. co*li'deki AmpC'nin tersine indüklenebilir enzimlerdir. Antibiyotiksiz ortamda yalnızca eser miktarda enzim üretilir. Fakat ß-laktam varlığında geçici olarak yüksek düzeyde üretilirler. Yüksek enzim üretimi (hyperproduction) genel olarak bakterinin kromozomal β-laktamaz genindeki *ampD* lokusundaki mutasyonlarla ortaya çıkar. Bu bakteriler klinik suşlar arasında boldur. Bu suşlara *derepressed* suşlar denir. Bu suşların ürettiği β-laktamazlara ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinler dayanıksız olup minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) bakterilerde güçlü bir şekilde enzim indüksiyonuna yol açar. Geniş spektrumlu sefalosporinler, ureidopenisilinler ve karboksipenisilinler enzime dayanıksızdır. Karbapenemler enzimin güçlü indükleyicileri olup enzime dayanıklıdırlar. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam yeterli inhibitör aktiviteye sahip değildirler.

Klebsiella grubu genelde A sınıfı kromozomal ß-laktamazlara sahiptir. Birçok *K. pneumoniae* suşu kromozomal SHV-1 enzimi üretir. Enzimin izoelektrik pH'sı (pI) 7.1 ile 8.6 arasındadır. *K. oxytoca* K1 veya KOXY tip enzim üretir. *Klebsiellae* grubunun bütün enzimleri konstitütif olarak düşük düzeyde üretilir. Ampisilin, amoksisilin, karbenisilin ve tikarsilini parçalarlar. Sefalotin ve sefaleksin gibi dar spektrumlu sefalosporinler ise SHV-1 ve K1 enzimleri tarafından hidroliz edilirler.

Proteus vulgaris ve *P. penneri* izolatları Bush şemasındaki 2e grubu olan A sınıfı kromozomal enzim üretirler (Tablo 3). Bazı izolatlar AmpC tip enzim üretir. K1 tip enzim üretenleri de mevcuttur. Enzimleri indüklenebilirdir. *P. mirabilis* enzimlerinin üretimi ihmal edilebilir derecede olup, enterobakteriler arasında ß-laktamlara en hassas olanıdır (21).

2.2.1.3. Enterobakterilerde Plazmid Orijinli ß-Laktamazlar

Plazmid orijinli ß-laktamazlar birçok gram-negatif bakteride sıklıkla bulunmaktadır. Bunlardan en sık olanı TEM-tipi olup, ilk olarak 1965'te Datta ve Kontomichalov (19) tarafından bir hastadan izole edilen ampisiline dirençli TEM olarak isimlendirilmiş bir *E. coli*'den izole edilmiştir ve TEM-tipi enzim adı verilmiştir.

Tablo 4. Plazmid Aracılı ß-Laktamazların Dağılımı (26).

ß-laktamaz	Konak bakteri	Prevalans	Düşünceler
Geniş spektrum			
HMS-1	*Enterobacteriaceae*	Nadir	
TEM-1	*Enterobacteriaceae* *N. gonorrhoeae,* *P. aeruginosa,* *H. influenzae.*	Çok sık	Bir çok bakteride çok sıktır
TLE-1	*E. coli*	Nadir	TEM-1'e çok benzer
TEM-2	*Enterobacteriaceae*	Sık	TEM-1'den bir amino asit farklı
LCR-1	*P. aeruginosa*	Nadir	
NPS-1	*P. aeruginosa*	Nadir	Sefsulodin konformasyonal değişiklik yapar
LXA-1	*Enterobacteriaceae*	Sık değil	Penisilin G' ye düşük afinite
OHIO-1	*Enterobacteriaceae*	Sık değil	Şimdiye kadar sadece Ohio izolatları
SHV-1	*Enterobacteriaceae*	Sık	*K. pneumoniae*'da genelde kromozomsal
SHV-2	*Enterobacteriaceae*	-	-
ROB-1	*H. influenzae* *H. pleuropneumoniae* *P. multocida*	Sık değil	Hem insan hem de hayvan izolatlarında
OXA, CARB, ampC ve Sefotaksimaz			
OXA-Tip			
İsimsiz (GN11499)	*B. fragilis*	Nadir	
OXA-3	*Enterobacteriaceae,* *P. aeruginosa*		
OXA-1	*Enterobacteriaceae,* *P. aeruginosa*	Sık	*E. coli*'de ikinci en sık tip
OXA-4	*Enterobacteriaceae*	Nadir	OXA-1' e çok benzer
OXA-5	*P. aeruginosa*	Nadir	
OXA-7	*E. coli*	Nadir	
OXA-6	*Enterobacteriaceae,* *P. aeruginosa*	Sık	Salmonella spp.'de ikinci en sık tip
CARB-Tip			
CARB-4	*P. aeruginosa*	Nadir	Sefsulodine direnç
SAR-1	*V. cholerae*	Nadir	
PSE-4	*P. aeruginosa,* *Enterobacteriaceae*	Sık değil	
(CARB-1) BRO-1	*Branhamella,* *Moraxella spp.*	Sık	Ampisilin ve sefaklora direnç
PSE-1 (CARB-2)	*P. aeruginosa,* *Enterobacteriaceae*	Sık	En sık *P. aeruginosa*'da
CARB-3	*P. aeruginosa*	Nadir	
AER-1	*A. hydrophila*	Nadir	
İsimsiz (N-3)	*P. mirabilis*	Nadir	PSE-1'e benzer
PSE-2	*P. aeruginosa,* *Enterobacteriaceae*	Sık değil	Oksasilini hızlı parçalar
PSE-3	*P. aeruginosa,* *Enterobacteriaceae*	Sık değil	
İsimsiz (N-29)	*P. mirabilis*		
AmpC-Tip			
CEP-1	*P. mirabilis*	Nadir	
CEP-2	*Achromobacter spp.*	Nadir	
Sefotaksimaz			
TEM-7	*Enterobacteriaceae*	?	Fransa, muhtemelen TEM-2 türevi
RHH-1	*Enterobacteriaceae*	Nadir	
CAZ-1 (TEM-5)	*Enterobacteriaceae*	Sık	Fransa, TEM—2 türevi, seftazidim direnci
CAZ-? (TEM-6)	*Enterobacteriaceae*	Sık değil	Almanya, TEM-2 türevi, seftazidim direnci
CTX-1	*Enterobacteriaceae*	Sık	Fransa, TEM-2 türevi, sefotaksim direnci

2.2.1.3.1. Plazmidle Kodlanan ß-Laktamazların Sınıflandırılması

Plazmidle kodlanan ß-laktamazlar, Bush şemasının 2b grubundadırlar (Tablo 3). Bu gruplar Medeiros'un sınıflamasındaki genişlemiş spektrumlu enzimler olan sefotaksimaz, karbenisilinaz ve oksasilinaz gruplarıyla az veya çok benzerlik gösterir (Tablo 4). Aşağıdaki gibi sınıflandırılmışlardır (19):

Klavulanik asitle inhibe olmayan, sefalosporin hidroliz eden enzimler (CEP-N, Grup1)'den CEP-1 bu gruba Bush tarafından sokulmuştur. Medeiros AmpC grubunda incelemektedir. *E. coli*'nin kromozomsal enzimleriyle immünolojik ve enzimolojik olarak benzerlik gösterir. CEP-1 nadiren *P. mirabilis*'te belirlenmektedir (19).

Klavulanik asitle inhibe edilen, penisilin hidroliz eden enzimler (PEN-Y, Grup 2a)'den NPS-1, penisilinleri sefalosporinlerden daha hızlı hidroliz ettiğinden dolayı Bush tarafından bu grupta sınıflandırılmıştır. Medeiros tarafından geniş-spektrumlu olarak sınıflandırılır. *P. aeruginosa*'da nadir rastlanan bir enzimdir (19).

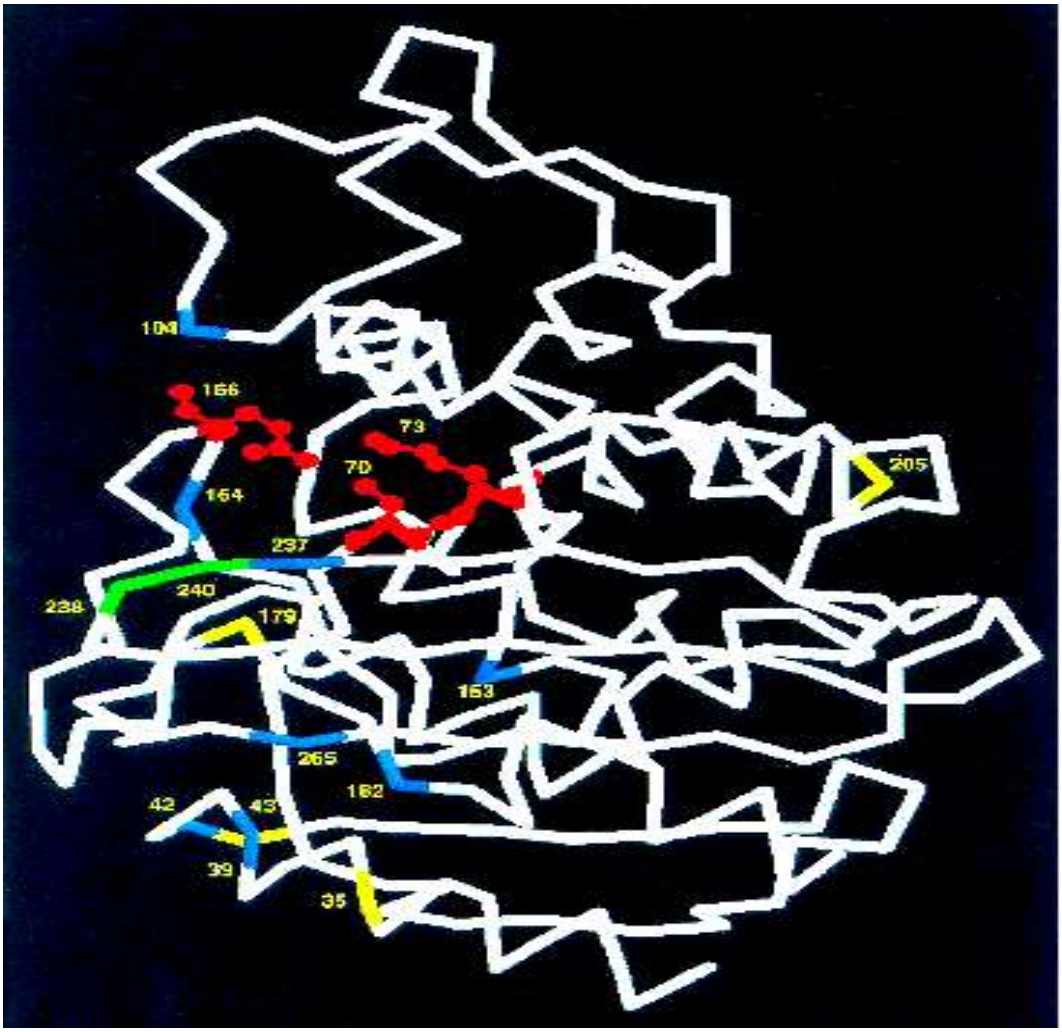
Genişçe-spektrumlu ß-laktamazlar (BDS-Y, Grup 2b) çok sık rastlanan TEM-1 (TEM) enzimini içerir. Dünyanın her yerinde *Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, P. cepacia, H. influenzae, N. gonorrhoeae, V. cholerae* ve diğer bazı gram-negatif basillerde rastlanmaktadır. TEM-1 geni *Tn*3, *Tn*4, *Tn*AB, *Tn*1699 ve *Tn*1700 transpozonlarında bulunmuştur. TEM-1'den hazırlanmış DNA problarıyla yapılan çalışmalar TEM-2, OXA-2 ve TLE-1 ile çapraz reaksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. TEM-1 enzimi *E. coli*'deki ampisilin direncinin %50'sinden sorumludur (21). TEM-1 ve TEM-2 biyokimyasal olarak izoelektrik noktalarıyla (pI) ayırt edilebilen ikiz enzimlerdir. Pozisyon 39'daki lizin yerine glutamin girmiştir (27). Amino asit sekansındaki değişim pI'sını 5.4'ten 5.6'ya yükseltmiştir. TEM-2 *Enterobacteriaceae*'lerde sıklıkla bulunmaktadır (19).

Bu grubun diğer bir enzimi SHV-1'dir (sülfidril grubu inhibe edilmiş). Genellikle *Enterobacteriaceae* izolatlarında rastlanır (19). SHV-1 penisilinlere karşı dar spektrumlu ß-laktamaz aktivitesi gösterir. İlk olarak *Klebsiella* cinsinde kromozomsal olarak gösterilmiştir. SHV-1, farklı bir β-laktamaz olan PIT- 1'i

kodlayan *incompatibility* tipindeki plazmidlerde ve transpozonda bulunmaktadır. *Klebsiella*'nın başka bir β-laktamazı olan LEN-1 *K. pneumoniae* suşlarında kromozomal olarak kodlanır. Nükleotid sekans analizi LEN-1'in bla_{SHV-1} gen sekansıyla çok benzer olduğunu göstermektedir. SHV-1'e biyokimyasal profili yakın diğer bir enzim OHIO-1'dir ve plazmidle kodlanmaktadır. Protein sekans analizi SHV-1 ile %98.1 amino asit benzerliği olduğunu ortaya koymaktadır. TEM-1 ile amino asit benzerliği ise %63.7'dir. Bu enzimlerin hiçbiri geniş-spektrumlu sefalosporinleri, sefamisini, monobaktamları veya karbepenemleri hidroliz edemez. Fakat, sefamandol ve sefoperazon gibi dar-spektrumlu sefalosporinleri ve penisilinleri inaktif edebilir. SHV-1 ve LEN-1 üreten bakteriler yaygındır. Fakat OHIO-1 sadece Amerika'nın Ohio eyaletiyle sınırlıdır (28).

Genişlemiş-spektrumlu ß-laktamazlar (GSBL veya EBS-Y, Grup 2b') plazmidle kodlanan enzimler olup, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi oksiimino-ß-laktamlara direnç oluştururlar. GSBL'ler ilk olarak 1983'te Almanya'da tarif edilmişlerdir ve oldukça sık ortaya çıkmaktadırlar. Dünyanın her yerinden rapor edilmektedirler (2, 4-13). Oksiimino-ß-laktamların kliniğe girmesinden hemen sonra *K. pneumoniae*, *E. coli* ve diğer az sayıdaki cinsler bu yeni ajanlara direnç gelişerek bu direnci plazmidler vasıtasıyla diğer bakterilere yaymaya başladı. Bu izolatların ürettiği genişlemiş spektrumlu enzimler GSBL olarak isimlendirildi. Aktif bölgelerine yakın yerlerinde bir veya daha fazla amino asitin değişmesiyle (substitution) TEM-, SHV- ve OXA-tipi ß-laktamaz türevleri veya varyantları oluşmaktadır. Böylece oksiimino- substratlar için enzimin afinitesi ve hidrolitik yeteneği artmaktadır (2, 3). Günümüzde 80'i aşkın TEM, 30'u aşkın SHV ve 9'a yakın OXA türevi vardır. Yeni enzimler ortaya çıktıkça internetteki bir Web sitesinde her bir enzimin amino asit değişiklikleri güncelleştirilerek verilmektedir (29). Her bir GSBL tipi kendine özgü bir amino asit değişimine sahiptir ve böylece hem enzimin substrat spektrumu hem de izoelektrik noktası değişir. Şekil 8'de TEM ve SHV β-laktamazlarında genişlemiş spektrumlu mutasyonların rölatif yerleri gösterilmektedir.

Karakterizasyon için pI tayini yeterlidir fakat aynı pI'ya sahip farklı enzimler türediğinden dolayı geninin sekanslanması daha kesin sonuçlar vermektedir. TEM türevlerinin pI'sı genelde 5.1-6.5, SHV türevlerinin 7.0-8.2 ve OXA türevlerinin ise 6.1 ile 8.0 arasındadır (3). GSBL'lerde bütün oksiimino-ß-laktamlara direnç artmasına rağmen, farklı substratlara karşı rölatif aktivitede değişikleri vardır. Çoğu enzim aztreonam ve seftazidimi sefotaksimden daha etkili hidroliz eder. GSBL kodlayan plazmidler genelde 80 kilobaz'dan (kb) büyük ve başka birçok antibiyotik direnç genlerini de taşırlar (2). Hastane personelinin elleri muhtemelen bu genleri taşıyan suşları hastadan hastaya nakleden aracılardan biridir. Bir hastanede birçok GSBL tipi olabilmesine rağmen, çoğunlukla tek tip dominanttır. Bazı hastanelerde GSBL-kodlayan plazmidler farklı suşlarca yayılabilir fakat bütün hastalardan aynı plazmidi içeren bakterilerin izole edildiği salgınlar da olabilir. Hastanede veya yoğun bakım ünitesinde kalma süresi GSBL enfeksiyonları için risk faktörleridir. Çünkü, uzun kalma süresi, altta yatan ciddi hastalıklar, cerrahi ve diğer invaziv girişimleri beraberinde fazla antibiyotik kullanımını getirmektedir (3).



Şekil 8. TEM (mavi) ve SHV (sarı) β-Laktamazlarda Genişlemiş Spektrumlu Mutasyonların Rölatif Yerleşimleri. Aktif bölge rezidüleri Serin-70, Glutamin-166 ve Lizin-73 kırmızı gösterilmektedir. Pozisyon 238 ve 240 (yeşil) hem TEM hem de SHV genişletilmiş spektrumlu mutasyonlarda değişen iki bölgeyi göstermektedir (1).

Karbenisilin hidroliz eden enzimler (CAR-Y, Grup 2c)karbenisilini benzilpenisilinden % 75 daha hızlı hidroliz ederler. Klavulanik asitle inhibe olurlar. CAR-Y grup enzimlerin çoğu bir transpozon üzerindedir. PSE-1 *Tn*1401 ve *Tn*1403 üzerinde, CARB-3 *Tn*1408 üzerindedir. Diğer CAR-Y grubu enzimlerden PSE-1 *P. aeruginosa*'da bulunur (19).

Kloksasilin hidroliz eden enzimler (CLX-Y, Grup 2d)kloksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidroliz eder (OXA-4 hariç). Klavulanik asitle inhibe

edilirler. *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'da bu grup enzimleren sık karşılaşılanları OXA-1 ve –2'dir. Bu enzimleri PSE-2 ve OXA-3 takip eder. OXA-4 ve –7'ye *Enterobacteriaceae'*de, OXA-6'ya *P. aeruginosa*'da ender rastlanır (19).

Klavulanik asitle inhibe olan, sefalosporin hidroliz eden enzimler (CEP-Y, Grup 2e)'den plazmidle kodlanan sadece FEC-1 enzimi vardır. Bu grup sefalosporinaz aktivitesi gösterir. Düşük konsantrasyonda klavulanik asitle inhibe olur (19).

İnhibitör dirençli ß-laktamazlar fonksiyonel olarak grup 2br olarak sınıflandırılmaktadır ve çoğunlukla TEM-1 genindeki nokta mutasyonları vasıtasıyla oluşmaktadırlar.

SHV-9'dan türeyen SHV-10 ise SHV genlerindeki nokta mutasyonları ile oluşan inhibitör dirençli β-laktamazdır (30).

IRT-1 enzimi inhibitör dirençli β-laktamazların genel adıdır ve çoğunlukla *E. coli* tarafından üretilir (31).

OXA-2'den türeyen OXA-15 ve OXA-10'dan türeyen OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17 diğer inhibitör dirençli β-laktamazlar olup OXA genindeki nokta mutasyonları ile oluşmaktadır (32).

2.2.2. Enterobakterilerde ß-Laktamaz Genlerinin Yayılım Yolları

Patojen bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılması büyük ölçüde konjugatif DNA transferine atfedilmektedir. Konjugatif transferin genel kategorisi hem bakteriyel plazmid hem de konjugatif olan transpozonların konjugasyonunu içine alır. Bu iki sistemin prototipleri RK2 plazmidi ve Tn*916* transpozonudur.

Yeni antibiyotiklerin keşfi ve geliştirilmesi yeni antibiyotik direncini beraberinde getirmiştir. Bu durum 1950'lerden başlayıp halen devam etmektedir. Kırk yıldan fazladır dokümantasyonu çıkarılan direnç siklüsünde ß-laktam ve aminoglikozidlere karşı oluşan direnç genlerinin yayılımı dikkate değerdir (15).

2.2.2.1. Bakteriyel Konjugasyon

Bir bakteriden diğerine hücre-hücre kontağı ile DNA transferine konjugasyon denir ve enerji harcanan bir tranporttur. İki işlem ile oluşur: DNA'nın hazırlanması ve çiftleşme için köprü oluşturulması. DNA'nın hazırlanması relaksozom oluşumu ile başlar. Relaksozom DNA/protein kompleksidir. DNA'nın transfer orijinine (*ori*T) bazı transfer proteinlerinin bağlanmasıyla oluşan bir komplekstir. Bu kompleks DNA'da tek iplikçikli bir kırık oluşturur ve DNA topolojik olarak rahat duruma geçer. Böylece, kırıkla oluşturulan tek iplikçikli DNA'nın açılıp transfer edildiği düşünülmektedir. Çiftleşme işleminde ise konjugatif pili vasıtasıyla verici ve alıcı hücrelerin stabilizasyonu sağlanmaktadır. Çiftleşme köprüsü DNA transfer edilirken hücreleri birbirine bağlar. Bu yüzden transformasyonun tersine konjugasyon işlemi DNA'yı parçalayan bir enzim olan DnaseI varlığında da devam eder. Çiftleşme köprüsü büyük çoğunluğu bilinmeyen yapıda kompleks bir multiprotein aparattır. Bakteriyel konjugasyon, transfer fonksiyonlarını kodlayan büyük plazmidlerle yapılır. Konjugatif plazmid hücre içinde bağımsız olarak replike olabilir veya bakteriyel genoma entegre olabilir. Konjugatif olduğu bilinen birçok plazmid *incompability* (Inc) grubu vardır (15). Plazmid *incompability*, plazmid içeren bir hücreye giren ikinci plazmidin ilkinin kalıtımını bozması olarak tanımlanabilir. İkinci plazmide uyumsuz (incompatible) denir. *Incompatibility* gruplarında replikasyon benzerliği mevcuttur. Aynı Inc grup plazmidler aynı bakteri hücresinde bulunamazlar. Çünkü replikasyon ve muhafaza edilmedeki (maintenance) benzerliklerinden dolayı plazmidin bir tipi bakteri populasyonu tarafından azaltılmaya başlanır (14, 15). Inc plazmidleri genetik benzerlik ve pilus yapılarına göre başlıca 4 sınıfta incelenirler. Birinci grup IncF, IncS, IncC, IncD ve IncJ'nin dahil olduğu IncF-benzeri (IncF-like) konjugatif plazmidlerdir. İkinci grup IncP, IncU, IncM, IncQ ve IncW'nun dahil olduğu IncP-benzeri (IncP-like) konjugatif plazmidlerdir. Üçüncü grup IncP ile benzerlik gösterir fakat, pilus yapıları farklıdır. Ti plazmid grubu olarak bilinirler ve IncX, IncH, IncN ve IncT bu gruba dahildir. Dördüncü grup da IncP grubuna benzer ama, kendine özgü pilus

özellikleri vardır. IncI, IncB ve IncK'yı içerir. İlk iki grup özellikle birçok ilaç direncinin klinik izolatlar arasında konjugal transferinden sorumludur. Yüz kilo baz (kb) F (IncF) plazmidi ve 60 kb RK2 (IncP) plazmidi sekansı tam olarak yapılmış ilk konjugatif plazmidlerdir. Gram-negatif bakteriler için prototipik plazmid sistemleri olmuşturlar. Bu plazmidlerle yapılan çalışmalar aşağıdaki konjugasyon modelini ortaya çıkarmıştır (15, 33):

a) Alıcı ve verici hücre kontaktı ve çiftleşme köprüsünün oluşması,
b) *ori*T içinde tek iplikçikli bir kırık ile başlatılan DNA relaksozom oluşumu
c) Konjugatif "*rolling circle*" replikasyon ve alıcıya tek iplikçikli DNA'nın transferi
d) Alıcıda DNA'nın yeniden sirküler hal alması (recircularization), komplementer DNA sentezi ve vejetatif replikasyon.

RK2 veya RP4 plazmidi izole edildiği 1960'lı yıllarda o dönem sık kullanılan 3 antibiyotiğe direnç genleri taşıyordu: kanamisin, penisilin ve tetrasiklin. Bu direnç genleri hastalardan izole edilen *Klebsiella* (RK2) ve *Pseudomonas* (RP4) arasında transfer edilmiştir. Bu plazmidin transferi *E. coli* ve bu organizmalar arasında gösterildiğinden dolayı, dar konak aralığına sahip IncF plazmidlerinden ayırmak için RK2'ye geniş konak aralıklı (broad-host range) denilmiştir. RK2'nin kodladığı TEM ß-laktamaz geni enterik bakterilerde iyi çalışmaktadır. Aynı zamanda non-enterik *Pseudomonas*, *Neisseria* ve *Haemophilus*'ta da çalışmaktadır. Bu özellik doğadaki suşlar arasında bu genin konjugatif transferi olduğuna delil oluşturmaktadır.

ß-laktamlara ve aminoglikozidlere direncin konjugatif olarak transfer edilmesine geçmişte ve günümüzde iki tehlikeli klinik izolat örneği vardır: *K. pneumoniae* EK105 ve *Yersinia pestis* 17/95 patojenleri. Her iki mikroorganizma da çoklu ilaç direncine sahiptir. *K. pneumoniae* EK105 suşu mobilize olabilen bir plazmid ve amikasin, ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, streptomisin, tobramisin, netilmisin,

oksasilin ve mezlosilin direnci kodlayan büyük bir konjugatif plazmid içermektedir. Bu izolatın direnç profili sepsis ve neonatal menenjitin etkeni olarak neredeyse tedavi edilemeyen ve sıklıkla öldürücü olan enfeksiyonlar meydana getirir. Aynı durum *Yersinia pestis* 17/95'te rastlanmıştır. Bu izolattaki konjugatif plazmid ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, streptomisin, spektinomisin, sulfonamidler, tetrasiklin ve minosikline direnç kodlamaktadır. Genelde gram negatif organizmaların plazmidleri gram negatiflerde replike olamamasına rağmen, gram pozitif organizmaların plazmidleri gram negatiflerde replike olabilmektedir. Gram negatiften gram pozitife yapılan birçok konjugasyon deneyinde alıcıda plazmid replikasyonunu sağlayabilmek için *shuttle* plazmide gram pozitife spesifik replikasyon bölgeleri eklenmelidir. Eğer varsa, doğada gram negatiften gram pozitif organizmalara bu şekildeki bir transfer henüz belirlenmemiştir. Bu olayın tersinin oluşması daha olasıdır. Doğada antimikrobiyal direnç genlerinin toprak organizmalarından orijin aldığı ve ilk olarak gram pozitif bakterilere, daha sonra bu bakterilerden gram negatiflere konjugasyonla transfer edildiği öne sürülmektedir. β-laktamaz genlerinin 1965'teki birçok raporda *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *E. coli* suşlarında plazmid aracılığıyla transfer edildiği ve 1970'te *S. aureus*'taki 53 kb'lık konjugatif bir plazmid tarafından aminoglikozid ve β-laktamaz genlerini taşıdığı belirtilmiştir.

Transfer edilebilir ilaç direncinin geçmişi β-laktamaz genleriyle paralellik gösterir. Gram negatif *E. coli* bakterilerinden diğer türlere marker genleri transfer etmek için RK2-orijinli vektörlerin kullanılmasıyla bütün *Enterobacteriaceae* türleri, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Agrobacteria*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Vibrio* ve birçok diğer bakteri türleri alıcı olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalar tek tip plazmid vasıtasıyla antibiyotik direnç genlerinin doğadaki konjugatif olarak transfer edilebilme potansiyelini göstermektedir. Normal florada bakteriler arası konjugatif transferin in vitro'ya göre daha etkin olduğu gösterilmiştir. Doğal konak habitatları bakterilerin konjugatif transferini artırmaktadır ve özellikle selektif baskının çok olduğu hastane ortamlarında daha sık ortaya çıkmaktadır (15).

2.2.2.2. Konjugatif Transpozisyon

Konjugatif transpozonlar kendini transfer edebilen, mobilizasyon yeteneğine sahip, replike olamayan genetik elemanlardır. Transferleri bir hücre içinde kromozom ile plazmid arasında ve hücreler arasında verici hücreden alıcı hücreye olmaktadır. Taşınamayan bir elemanı veya plazmidi transfer edebilirler. Konjugasyonda olduğu gibi, konjugatif transpozonların transfer işlemi hücre-hücre kontağına ihtiyaç göstermekte ve DnaseI enziminden etkilenmemektedir. Bu elemanlar bağımsız olarak replike olamadıklarından dolayı, genomik DNA'ya veya plazmid DNA'sına entegre olarak hücrede bulunurlar. Konjugatif plazmidler gibi ilaç direnci kodlarlar ve bakteriler arasında yayarlar. Geniş konak aralıklı olarak bilinmelerine rağmen, daha çok gram pozitif bakteriler arasında bulunurlar (15, 33).

2.3. Klinik Antibiyotik Kullanımı ile β-Laktamaz Evolüsyonu Arasındaki İlişki

Antibiyotik direncinde rol alan genlerin antibiyotik üreten organizmalardan köken aldığı en sık önerilen hipotezlerden biridir. Bu organizmalar ürettikleri antimikrobiyal maddelerden kendilerini korumak için bu maddelere direnç özelliği kodlayan genleri taşırlar. Sonuçta bu genler diğer bakterilere de taşınarak bu organizmaları da dirençli yapabilmektedir. Bu konuyla ilgili hipotezler, direnç determinantlarının evolüsyon ve yayılımının doğal olarak üretilen antibiyotiklerin oluşturduğu seçici kuvvetlerin bir sonucu olabileceğini göstermektedir. Bu maddeler her ne kadar bol olsa da toprak ve suda dilüsyonlar halinde bulunmaktadır. Bilgiler, antibiyotik direncinin klinik tıpta endüstriyel olarak yapılmış antibiyotiklerin aşırı kullanımından ve çiftlik hayvanlarının yemlerine karıştırılmasından kaynaklanan güçlü seçici kuvvetlerin ortaya çıkışı ile meydana geldiğini desteklemektedir (16, 34).

Antimikrobiyal ajanların 1940'larda kullanıma girmesinden beri bu ajanlara karşı devamlı olarak mikroorganizmalar direnç geliştirmektedirler. Genetik elemanların aralarında paylaşılması ile bu direnç yayılmaktadır. Enfeksiyon riski

taşıyan hasta grupları immun sistemi baskılanmış ve ciddi şekilde hareketsiz yaşayan hastalardır. Bu populasyona örnek olarak özellikle organ transplant alıcıları, onkoloji hastaları, HIV' la (Human Immunodeficiency Virüs) enfekte hastalar verilebilir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda sık olmayan patojenler rastlanmakta ve çoğunluğuna ampirik tedavi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu hastalarda teşhis ve cerrahi müdahale öncesi profilaksi amacı ile bol miktarda antibiyotik kullanılmaktadır. Böylesine yaygın antibiyotik kullanımı ortamın seleksiyon hızını artırdığından, hastaların dirençli bakteriyel suşları kazanma şansını da artırmaktadır (35).

Hastane ve toplumda hastaların florası birden fazla antibiyotik baskısı altındadır. Özellikle hastanelerde dalgalı ve kompleks antibiyotik çevreleri olarak yoğun bakım üniteleri örnek verilebilir. Bu bölümlerde farklı hastalarda farklı antibiyotiklerle karşılaşan aynı tür bakteriyel organizmalar olabildiği gibi, belli bir hastada farklı antibiyotiklerle karşılaşan aynı tür bakteriler bulunabilir. Genellikle bu bölümlerde devamlı, bir antibiyotikle veya kombinasyonlarıyla tedavi döngüsü vardır. Bu yüzden bu tip çevreler farklı dirence sahip bakteriyel varyantların seleksiyonuna yol açmaktadır. Örneğin; bir yoğun bakım ünitesinde aynı anda bir hasta sefotaksim ile tedavi edilirken diğerlerinin seftazidimle tedavi edilmesi genel bir yöntem değildir. Aksi taktirde ünitede dolaşan bakteriler her iki ilaçla da karşılaşacaktır. Üçüncü kuşak sefalosporinlere ve β-laktamaz inhibitörlerine aynı anda direnç gelişmesi dalgalı antibiyotik çevrelerine karşı oluşan adaptasyonun mükemmel bir örneğidir. Şayet plazmid aracılı TEM-1 β-laktamaz taşıyan bir suş seftazidimle karşılaşırsa, seftazidimin bu bakteriye karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) artmaktadır. Bu olay klasik *stepwise* seleksiyon deneyine benzer. Varyant suşlar amoksisilin veya amoksisilin/klavulanat ile test edilirse, seftazidime daha fazla direnci olan bakterinin amoksisiline direnci azalacaktır. Böylece, bazı maddelerin MİK'ini artıran mutasyonların diğer maddelerin MİK'ini azaltabildiği görülmektedir. Çevremizde her iki ilacın da birlikte bulunması bakterilerin hayatta kalabilme sorununu gündeme getirmektedir. Son zamanlara kadar bakterilerin bir

hücrede veya bir plazmidde birden fazla β-laktamaz genini içererek bu sorunu çözdüğü görünmektedir (16).

Günümüzde, hastanede yatan hastalarda metisilin dirençli *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar, vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*, plazmidle kodlanan GSBL'li *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Acinetobacter* türleri gibi çoklu ilaç direncine sahip bakteriler dominant olarak görülmektedir. Antibiyotik kullanımı ve direnç arasındaki ilişki birçok nozokomiyal patojen arasında devamlı olarak gözlenmektedir. Son 10 yıl içinde en çok dikkati çeken örnek geniş spektrumlu sefalosporin ve β-laktamlara dirençli *Enterobacter* türleridir. Antibiyotik sınırlaması ve enfeksiyonların kontrol altında tutulmasının ekonomik etkili tedaviyi peşinde getirdiği belirtilmektedir (34, 36).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Klinik Bakteri Suşları

Bu çalışma Haziran 1999 ile Haziran 2001 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

K.T.Ü. Tıp Fakültesi'nin 492 yataklı Farabi Hastanesi'nde, yatan ve poliklinik hastalarının çeşitli materyallerinden 05 06 2000 ile 20.07.2000 tarihleri arasında, yaklaşık 2 ay boyunca Merkez Rutin Mikrobiyoloji Laboratuarı'nda izole edilen ampisilin dirençli *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri toplandı. Tablo 5'te bakteri izolatlarının türü, izole edildiği tarih, izole edildiği materyal, materyalin geldiği hastane birimi, izolasyon tarihi ve izolat kodu gösterilmiştir.

Tablo 5. İzole Edilen Ampisiline Dirençli *Enterobacteriaceae* Türleri

NO	İzolat Kodu*	İzole Edilen Bakteri Türü	İzolasyon Tarihi	İzole Edildiği Materyal	Materyalin Geldiği Birim
1	TRE002	*Proteus mirabilis*	12.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
2	TRE004	*Proteus mirabilis*	12.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
3	TRE006	*E. coli*	12.06.2000	İdrar	Enfeksiyon Polikliniği
4	TRE008	*Klebsiella pneumoniae* ssp.*ozaenae*	13.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
5	TRE009	*E. coli*	13.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
6	TRE010	*E. coli*	13.06.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
7	TRE011	*Proteus mirabilis*	13.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
8	TRE012	*E. coli*	13.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
9	TRE014	*E. coli*	14.06.2000	İdrar	Acil Polikliniği
10	TRE016	*E. coli*	14.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
11	TRE017	*Klebsiella oxytoca*	14.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
12	TRE018	*Enterobacter cloacae*	16.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
13	TRE020	*Klebsiella pneumoniae* ssp.*ozaenae*	05.06.2000	BOS	Enfeksiyon Servisi
14	TRE021	*Serratia marcescens*	05.06.2000	Burun Sürüntüsü	Cerrahi Yoğun Bakım
15	TRE022	*Enterobacter aerogenes*	07.06.2000	Kan	Enfeksiyon Servisi
16	TRE024	*E. coli*	13.06.2000	Trakeal Aspirat	Cerrahi Yoğun Bakım
17	TRE025	*Klebsiella pneumoniae*	13.06.2000	Trakeal Aspirat	Pediatri Yoğun Bakım
18	TRE026	*Enterobacter sakazakii*	13.06.2000	İdrar	Cerrahi Yoğun Bakım
19	TRE027	*E. coli*	14.06.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
20	TRE028	*E. coli*	14.06.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
21	TRE029	*Enterobacter aerogenes*	13.06.2000	İdrar	Pediatri Yoğun Bakım
22	TRE031	*Klebsiella pneumoniae*	15.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
23	TRE032	*E. coli*	15.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
24	TRE034	*Proteus vulgaris*	16.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
25	TRE036	*Serratia marcescens*	14.06.2000	Kan	Pediatri Adolesan Servisi
26	TRE037	*Klebsiella pneumoniae*	16.06.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
27	TRE038	*E. coli*	20.06.2000	İdrar	Acil Servis
28	TRE040	*Klebsiella pneumoniae*	20.06.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
29	TRE044	*Klebsiella pneumoniae*	20.06.2000	İdrar	Pediatri Süt Çocuğu Servisi
30	TRE045	*Klebsiella oxytoca*	22.06.2000	Kan	Dahiliye Servisi-I
31	TRE048	*Enterobacter aerogenes*	20.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
32	TRE049	*E. coli*	20.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
33	TRE050	*Klebsiella pneumoniae* ssp.*ozaenae*	20.06.2000	Boğaz Sürüntüsü	Dahiliye Servisi-II
34	TRE051	*Klebsiella oxytoca*	20.06.2000	Kateter	Dahiliye Servisi-I
35	TRE053	*E. coli*	20.06.2000	İdrar	Ortopedi Servisi
36	TRE054	*Proteus mirabilis*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
37	TRE055	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
38	TRE056	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
39	TRE057	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
40	TRE058	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
41	TRE059	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
42	TRE060	*E. coli*	21.06.2000	İdrar	Pediatri Acil Polikliniği
43	TRE061	*E. coli*	23.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
44	TRE062	*E. coli*	23.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
45	TRE063	*Klebsiella oxytoca*	22.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
46	TRE064	*Klebsiella pneumoniae*	22.06.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
47	TRE066	*E. coli*	23.06.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
48	TRE067	*E. coli*	23.06.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
49	TRE069	*Enterobacter cloacae*	23.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
50	TRE070	*E. coli*	23.06.2000	İdrar	Kadın Doğum Polikliniği
51	TRE071	*Proteus mirabilis*	23.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
52	TRE072	*E. coli*	26.06.2000	Yara	Dahiliye Servisi-I

Tablo 5'in devamı

53	TRE073	*E. coli*	26.06.2000	Kan	Pediatri Yoğun Bakım
54	TRE074	*Klebsiella oxytoca*	27.06.2000	İdrar	Acil Servis
55	TRE075	*E. coli*	27.06.2000	Yara	Dahiliye Servisi-I
56	TRE077	*Klebsiella pneumoniae* ssp.*ozaenae*	26.06.2000	Yara	Ortopedi Servisi
57	TRE078	*E. coli*	26.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
58	TRE079	*E. coli*	26.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
59	TRE082	*Klebsiella oxytoca*	26.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
60	TRE083	*Klebsiella pneumoniae*	26.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
61	TRE085	*Klebsiella pneumoniae*	28.06.2000	Kan	Pediatri Adolesan Servisi
62	TRE087	*Klebsiella pneumoniae*	26.06.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
63	TRE088	*Enterobacter aerogenes*	27.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
64	TRE089	*Enterobacter aerogenes*	27.06.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
65	TRE090	*Escherichia coli*	27.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
66	TRE091	*Klebsiella oxytoca*	27.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
67	TRE092	*E. coli*	27.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
68	TRE093	*Klebsiella oxytoca*	28.06.2000	İdrar	Dahiliye Polikliniği
69	TRE094	*Klebsiella pneumoniae*	28.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
70	TRE095	*E. coli*	28.06.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
71	TRE097	*Klebsiella pneumoniae*	29.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
72	TRE098	*E. coli*	29.06.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
73	TRE099	*Klebsiella oxytoca*	30.06.2000	İdrar	Ortopedi Servisi
74	TRE102	*E. coli*	30.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
75	TRE103	*E. coli*	30.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
76	TRE105	*Enterobacter cloacae*	30.06.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
77	TRE107	*Enterobacter aerogenes*	03.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
78	TRE108	*Enterobacter cloacae*	03.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
79	TRE109	*E. coli*	03.07.2000	İdrar	Kadın Doğum Polikliniği
80	TRE111	*E. coli*	03.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
81	TRE112	*Enterobacter sakazakii*	03.07.2000	İdrar	Pediatri Adolesan Servisi
82	TRE113	*E. coli*	03.07.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
83	TRE114	*E. coli*	03.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
84	TRE115	*Klebsiella oxytoca*	03.07.2000	Boğaz sürüntüsü	Dahiliye Servisi-II
85	TRE116	*Proteus mirabilis*	03.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
86	TRE118	*E. coli*	04.07.2000	İdrar	Pediatri Yoğun Bakım
87	TRE121	*E. coli*	04.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
88	TRE122	*Klebsiella oxytoca*	04.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
89	TRE124	*Klebsiella oxytoca*	05.07.2000	İdrar	Kardiyoloji Polikliniği
90	TRE127	*Klebsiella oxytoca*	05.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
91	TRE129	*Proteus mirabilis*	05.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği.
92	TRE130	*E. coli*	06.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
93	TRE131	*Klebsiella oxytoca*	06.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
94	TRE132	*E. coli*	06.07.2000	Şant	Pediatri Acil Polikliniği
95	TRE133	*Enterobacter agglomerans*	06.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
96	TRE134	*Enterobacter aerogenes*	06.07.2000	İdrar	Acil Servis
97	TRE135	*E. coli*	07.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
98	TRE136	*E. coli*	07.07.2000	İdrar	Dahiliye Polikliniği
99	TRE137	*E. coli*	07.07.2000	İdrar	Üroloji Polikliniği
100	TRE139	*Klebsiella pneumoniae*	08.07.2000	İdrar	Cerrahi Yoğun Bakım
101	TRE140	*Enterobacter aerogenes*	11.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-I
102	TRE141	*Klebsiella pneumoniae spp. ozaenae*	10.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
103	TRE142	*E. coli*	10.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
104	TRE143	*E. coli*	10.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
105	TRE144	*Proteus mirabilis*	10.07.2000	İdrar	Dahiliye Servisi-II
106	TRE146	*Klebsiella pneumoniae*	10.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği.
107	TRE147	*Klebsiella pneumoniae*	10.07.2000	Yara	Dahiliye Polikliniği
108	TRE149	*Enterobacter aerogenes*	11.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği.

Tablo 5'in devamı

109	TRE150	*Klebsiella pneumoniae*.ssp. *ozaenae*	12.07.2000	Yara	Fizik Tedavi Servisi
110	TRE151	*E. coli*	12.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
111	TRE152	*E. coli*	12.07.2000	Kan	Dahiliye Servisi-I
112	TRE153	*E. coli*	12.07.2000	Trakeal aspirat	Pediatri Yoğun Bakım
113	TRE154	*E. coli*	12.07.2000	BOS	Pediatrik Cerrahi Servisi
114	TRE155	*E. coli*	12.07.2000	Kan	Acil Polikliniği
115	TRE157	*E. coli*	13.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
116	TRE158	*E. coli*	13.07.2000	Ameliyat Materyali	Genel Cerrahi Servisi
117	TRE159	*E. coli*	17.07.2000	Kan	Dahiliye Servisi-I
118	TRE160	*E. coli*	17.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
119	TRE161	*Klebsiella oxytoca*	18.07.2000	İdrar	Enfeksiyon Servisi
120	TRE162	*Klebsiella pneumoniae*	18.07.2000	İdrar	Beyin Cerrahi Servisi
121	TRE163	*E. coli*	18.07.2000	Kan	Kardiyoloji Servisi
122	TRE164	*Enterobacter aerogenes*	18.07.2000	Trakeal aspirat	Enfeksiyon Servisi
123	TRE165	*Klebsiella pneumoniae*	17.07.2000	Trakeal aspirat	Pediatri Yoğun Bakım
124	TRE166	*Proteus mirabilis*	17.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
125	TRE167	*Klebsiella pneumoniae*	17.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
126	TRE168	*E. coli*	17.07.2000	İdrar	Pediatri Acil Polikliniği
127	TRE170	*E. coli*	17.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
128	TRE171	*E. coli*	17.07.2000	İdrar	Kadın Doğum Polikliniği
129	TRE172	*Proteus vulgaris*	17.07.2000	İdrar	Pediatri Polikliniği
130	TRE173	*Klebsiella .pneumoniae* .ssp.*ozaenae*	17.07.2000	İdrar	Acil Polikliniği
131	TRE174	*Klebsiella pneumoniae*	17.07.2000	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
132	TRE175	*Klebsiella pneumoniae*	19.07.2000	Sonda idrarı	Beyin Cerrahi Servisi
133	TRE176	*Klebsiella pneumoniae*	19.07.2000	Yara	Plastik Cerrahi Servisi

* TRE; Trabzon *Enterobacteriaceae*

3.1.2. Laboratuar Suşları, Standart Suşlar ve Plazmidler

Bu çalışmada, konjugasyon deneyleri için alıcı hücre olarak *E. coli* K-12 laboratuar suşu J53-2 (F^-, methionin ve prolin amino asitleri için oksotrof ve rifampisin dirençli, Metin Otkun'dan sağlandı) ve antimikrobiyal hassasiyet testleri için *E. coli* ATTC 25922 suşu kontrol olarak kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) deneylerinde kontrol kalıp DNA olarak ve Southern blot hibridizasyon deneylerinde TEM ve SHV gen problarını hazırlamak için *E. coli* 7604 [(TLE-1, TEM-1 genleri)] veya *E. coli* JM109 [pBR322 (TEM-1 geni)], *E. coli* J53 [RP4 (TEM-2 geni)], *E. coli* J53 [pUD18 (SHV-3 geni)] suşları ve plazmidleri kullanıldı. Plazmid büyüklüklerinin tahmin edilebilmesi için *E. coli* V517 suşundan izole edilen plazmidler referans alındı.

3.1.3. Gereçler, Besiyerleri ve Kimyasallar

3.1.3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan gereçler farklı firmalardan temin edildi. Mikrosantrifüj Heraeus, çalkalayıcılı benmari GFL, benmari, inkübatör Memmert, -35ºC derin dondurucu (deep freeze) Bosch, vorteks Janke&Kunkel, hassas terazi Sartorius (Almanya), otomatik pipetler Rainin, mini-column plasmid purification filters Promega, deiyonize su sağlayıcısı Barnstead, Eppendorf tüpleri, polaroid kamera filmleri Sigma, elektroforez tankı, jel küveti ve tarakları Owl, doğru akım üreteci E-C Apparatus Corporation (ABD), ultraviyole transillüminatörü Vilber Lourmat (Fransa), polaroid kamera, manyetik karıştırıcı Stuart, buz makinesi Scotman, thermocycler Techne Genius (İngiltere), pHmetre Hanna (Portekiz), mikrodalga fırın Beko , distile su cihazı Şimşek Laborteknik, Pastör fırını Nüve (Türkiye), otoklav Medexport (Rusya),.

3.1.3.2. Besiyerleri ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasal maddeler değişik firmalardan sağlandı. Yeast extract, agar-agar, Chrintensen urea broth, triple sugar iron agar (TSIA), sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), sodium dodecyl sulfate (SDS), methyl red, α-naphtol, glacial acetic acid, hydrochloric acid (HCl), potassium hydroxide (KOH), glycerol, bromphenol blue, magnessium chloride ($MgCl_2$), di-potassium hydrogene phosphate (K_2HPO_4), sodium citrate, di-potassium mono hydrogene phosphate (K_2HPO_4), *p*-dimethylaminobenzaldehyde, bromphenol blue, ammonium chloride (NH_4Cl), α-naphtol, di-sodium hydrogene phosphate (Na_2HPO_4), , Chrintensen urea broth Merck, Rifocin Hoecst (Almanya), guanidine aminomethanomidine thiocyanate, trizma® hydrochloride (Tris-HCl), trizma® base (Tris base), isoamyl alcohol, potassium acetate, xylene cyanole, agarose, L-proline, DL-methionin, etidium bromide, isopropanol, tween 20, Rnase, diatomaceous earth, ethylene-diaminetetra-acetic acid (EDTA), maleic acid, deoxy

nucleotide three phosphates (dNTP) set Sigma, ampicillin sodium salt FischerBiotech, nylon transfer membrane BioRad, *Eco*RI Gibco BRL , molecular size marker (λ phage DNA digested with *Hind*III), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, *Taq* DNA polymerase MBI Fermentas, Hi-Lo™ DNA Marker Minessota Molecular, DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit I Mannheim Boehringer (ABD), tryptone, Mueller Hinton broth, eosine methylene blue (EMB) agar, antibiotic disks Oxoid, Bacto® peptone, Simmons citrate agar Difco, oligonucleotide primers IDT (İngiltere), D(+) glukoz monohidrat Horosan Kimya (Türkiye), potassium dihydrogene phosphate (KH_2PO_4) Pancreac (İspanya) firmalarından sağlandı.

3.1.4. Besiyerleri ve Ayıraçlar

a. Luria Bertani (LB) Buyyon ve Agar: % 1 tryptone, % 0.5yeast extract % 0.5 NaCl (pH 7.4) distile suda hazırlandı. Besiyeri pH'sı konsantre sodyum hidroksit ile ayarlandı. Buyyona istendiğinde % 1.5 agar ilavesi ile LB agar yapıldı ve 121˚C 1 atm basınçta 15-20 dak otoklavlandı.

b. İndol Test Besiyeri: % 1.5 Bacto peptone, % 0.5 NaCl, pH 7.1 distile suda hazırlandı. Bir mililitre olarak tüplere dağıtılıp otoklavlandı.

c. Metil kırmızısı/Voges-Proskauer (MR-VP) Besiyeri: % 0.7 Bacto peptone, % 0.5 glukoz, % 0.5 K_2HPO_4 (pH 6.9) oranlarında distile su ile hazırlandı. Bir mililitre olarak tüplere dağıtılıp otoklavlandı.

d. Minimal Medyum (5X M9 medium): % 3 Na_2HPO_4, % 1.5 KH_2PO_4, % 0.5 NH_4Cl, % 0.25 NaCl deiyonize su kullanılarak hazırlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

e. Minimal Agar: Minimal agar yapmak için (1 lt için), 800 ml deiyonize suya 15 gr agar ilave edildi ve otoklavlandı. Agar karışımı 45-50˚C' ye soğutuldu ve

aynı sıcaklığa ayarlanmış 200 ml 5 x M9 minimal medyum eklendi ve iyice homojenize etmek için karıştırıldı. Karbon kaynağı olarak % 0.2 (v/v) glukoz solüsyonu ilave edildi. Organizmanın oksotrof olduğu maddelerden filtreyle steril edilmiş amino asit solüsyonlarından 20 µg/ml olacak şekilde ilave edildi. Steril petri plaklarına döküldü ve kullanılana kadar 4˚C' de saklandı.

f. Kovacs Ayıracı: % 75 isoamyl alcohol, % 25 konsantre HCl, % 5 *p*-dimethyl aminobenzaldehyde hazırlandı ve 4˚C' de saklandı.

g. Metil Kırmızısı Ayıracı: % 0.02 methyl red, % 60 etil alkol (%95'lik) oranında deiyonize su ile hazırlandı ve 4˚C' de saklandı.

h. Voges-Proskauer Ayıraçları: İki ayıraç hazırlandı. İlk ayıraç % 5 α-naphtol, % 100 etil alkol (%95'lik) oranlarında hazırlandı; ikinci ayıraç olarak % 40 KOH hazırlandı ve 4˚C' de saklandı.

3.1.5. Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

a. Solüsyon I: 50 mM glukoz, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), olarak deiyonize su ile hazırlandı ve 121˚C' de 1 atm basınçta 10 dk otoklavlandı. Sonuç solüsyona 0.4 mg/ml Rnase eklenerek 4˚C' de saklandı.

b. Solüsyon II: 0.2 N NaOH, % 1 SDS her purifikasyon işleminde steril deiyonize su ile taze olarak hazırlandı.

c. Solüsyon III: 60 ml 5 M potassium acetate, 11.5 ml glacial acetic acid, 28.8 ml deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Son hacimde potasyum iyonu 3 M, asetat iyonu 5M oldu. Solüsyon otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

d. DNA Bağlama Matriksi ve Guanidin Solüsyonu: 250 mg/ml olacak şekilde steril deiyonize su ile 3 saat yıkanmış diatomaceous earth kullanılarak DNA bağlama matriksi hazırlandı. Bu matriksin 1.5 ml'si 4 M guanidine

aminomethanomidine, 50 mM Tris-HCL (pH 7.0), 20 mM EDTA (pH 8.0) olacak şekilde hazırlanmış guanidin solüsyonuna karıştırıldı ve 4˚C' de saklandı.

e. TE Tamponu: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 8.0) deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi için Solüsyonlar

a. TAE Elektroforez Tamponu: 50 x konsantre olarak hazırlandı. % 24.2 Tris base, % 5.71 glacial acetic acid, % 3.72 EDTA (pH~8.5) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. pH ayarı için NaOH peletleri kullanıldı. Çalışma solüsyonu olarak distile veya deiyonize su ile sulandırılarak 1 x solüsyon kullanıldı. Çalışma solüsyonunda 40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA iyonları sağlanmış oldu.

b. Etidium Bromide Solüsyonu: 10 mg/ml (w/v) stok solüsyon olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan muhafazalı olarak saklandı.

c. Yükleme tamponu (Loading tamponu): % 20 glycerol, 1 mg/ml (w/v) bromphenol blue, 1 mg/ml (w/v) xylene cyanole deiyonize su ile hazırlandı.

3.1.7. Southern Blot Hibridizasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

a. Vial 1: DIG-High Prime, 50 µl.

b. Vial 2: İşaretlenmemiş kontrol DNA, 20 µl pBR328, 200 µg/ml, *Bam* HI ile linearize edilmiş.

c. Vial 3: DNA sulandırım tamponu, 1 ml

d. Vial 4: Anti-digoxygenin-AP konjugat, 100 µl

e. Vial 5: Nitro blue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP) konsantre edilmiş stok solüsyon, 6 x 1 ml.

f. Vial 6: Blocking solüsyonu, 4 x 100 ml, 10x konsantre.

g. Denatürasyon Solüsyonu: 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl deiyonize su ile hazırlandı.

h. Nötralizasyon Solüsyonu: 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5); 3 M NaCl deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

i. Standart Prehibridizasyon Tamponu: 5 x SSC, % 1 (w/v) blocking solüsyonu, % 0.1 N-lauroylsarcosine, % 0.02 SDS.

j. Standart Hibridizasyon Tamponu: Standart prehibridizasyon solüsyonu içinde DIG-işaretli prob (5-25 ng/ml) sulandırılarak hazırlandı.

k. 2 x Yıkama solüsyonu: % 0.1 SDS içeren 2 x SSC hazırlandı.

l. Tampon 1 (maleic acid tamponu): 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl (pH 7.5) deiyonize suda hazırlandı.

m. Tampon 2 (blocking solüsyonu): 10x blocking solüsyonu (vial 6) maleic acid tamponu ile 1:10 sulandırılarak 1x çalışma solüsyonu elde edildi.

n. Tampon 3 (detection tamponu): 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$ (pH 9.5) deiyonize su ile hazırlandı.

o. Antikor solüsyonu: tampon 2 içinde 1:2000 olacak şekilde alkalin fosfata konjuge edilmiş anti-digoxygenin (anti-digoxygenin-AP) yani vial 4 sulandırıldı.

p. Yıkama Tamponu: Maleic asid tamponu+% 0.3 tween 20 (v/v).

q. Renk-substrat solüsyonu: Daima taze hazırlandı. İki ml tampon 3'e 40 µl NBT/BCIP stok solüsyonu eklendi.

r. SSC Tamponu: 20 x olacak şekilde konsantre hazırlandı, % 17.5 NaCl, % 8.8 sodium citrate deiyonize suda hazırlandı (sonuç konsantrasyon 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) ve yine deiyonize su ile istenilen konsantrasyona sulandırılarak kullanıldı.

3.2. METOD

3.2.1. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları

Merkez Rutin Mikrobiyoloji Laboratuarı'ndan EMB agarda üretilmiş olarak sağlanan klinik enterobakterilerden steril bir öze yardımıyla tek koloni alınarak taze EMB agar besiyerine pasaj edildi. İnkübatörde atmosferik ortamda 37˚C' de 18-24 saat üretilip saflaştırıldıktan sonra indol üretme, metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve sitrat kullanma testi (IMVIC), üre hidroliz deneyi ve TSI agarda üreme özellikleri belirlendi. Test sonuçları, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'de (37) belirtilen biyokimyasal yöntemlere dayalı kriterlere göre değerlendirilerek, enterobakterilerin tür identifikasyonları yapıldı.

a. İndol Üretme Testi: Testin amacı, triptofan amino asitinden indol maddesinin üretildiğinin tespitidir. İndol üretimi bakterinin triptofanız enzimi ürettiğini göstermektedir. Triptofanaz enzimi pridoksal fosfat koenzimi varlığında triptofanı indol, piruvik asit ve amonyağa deamine eder. Kovacs ayıracı eklendiğinde aldehit (*p*-dimethylaminobenzaldehyde) ile kombine olup kültür yüzeyinde kırmızı renkli bir kompleks olarak birikir (38).

EMB agarda saf olarak üretilen testi yapılacak bakterilerden 1-2 koloni 2 ml indol buyyona ekildi. Bir vorteksle karıştırıldıktan sonra 35˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Kültüre 0.5 ml Kovacs ayıracı damlatıldı ve sallandıktan sonra yüzeyde kırmızı halka oluşanlar indol pozitif, renk oluşmayanlar ise indol negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu kullanıldı.

b. Metil Kırmızısı (MR) Testi: Testin amacı, indikatör bir besiyerinde glukozun karışık (mixed) asit fermantasyonu sonucu asidik bir pH değişikliğini göstermektir. *Enterobacteriaceae* Embden-Meyerhof-Parnas biyokimyasal yolu ile glukozu piruvik asite dönüştürür. Piruvik asit metabolizması laktik, asetik, formik

ve suksinik asit gibi karışık asitlerin oluşmasını sağlar. Ortam pH'sı yaklaşık 4.4'e düşer. Metil kırmızısı ayıracı bu pH'da kırmızı renklidir (38).

Yarım ml MR-VP buyyona testi yapılacak bakteri ilave edildi ve 35˚C'de 18-24 saat enkübe edildi. Kültüre iki damla metil kırmızısı damlatıldı. Ayıracın rengi kırmızı kalınca pozitif, sarıya dönünce negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu kullanıldı.

c. Voges-Proskauer (VP) Testi: Testin amacı, butilen glikol fermantasyon yolu ile bakterilerin glukozu fermente ederek butilen glikol oluşumunun bir ara ürünü olan asetoin üretiminin belirlenmesidir. Asetoin üretim yolunu seçen organizmalar fazla miktarda butilen glikol, etanol, asetoin ve organik asitler gibi nötral ürünler üretirler. Atmosferik ortamda ve KOH varlığında asetoin maddesi kırmızı renkli diasetile oksitlenir. α-naphtol reaksiyonu hızlandırır (38).

Yarım ml MR-VP buyyona testi yapılacak bakteriden ilave edildi ve 35˚C' de 18-24 saat enkübe edildi. Kültüre 3 damla % 40'lık KOH damlatıldıktan sonra 6 damla α-naphtol solüsyonu damlatıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve havaya maruz kalması için kapakları açılarak 10-15 dk beklendi. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.

d. Sitrat Kullanma Testi: Testinin amacı, bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanma yeteneklerinin belirlenmesidir. Organizmalar sitratı hücre içine alan enzim olan permeaz ve parçalayan enzim olan sitrat liyaza sahipse Simmons sitrat agarda alkali bir reaksiyon oluşturur. Besiyerinde bulunan bromtimol mavisi ayıracının yeşil rengi maviye döner (38).

Yatık olarak tüplerde katılaştırılmış olan yeşil renkli Simmons sitrat agar (pH 7.0) yüzeyine testi yapılacak bakteri kolonisinin bir kısmı öze ile yayılarak ekim yapıldı. Ağır inokülüm yanlış pozitif sonuç verebileceğinden dolayı az sayıda

bakteri ekilmeye dikkat edildi. Tüp kapağı gevşek olarak kapatılıp 35˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Koyu Prusya mavisi pozitif olarak, besiyerinin normal rengi olan yeşil renk değişmemiş ise negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.

e. Üre Hidroliz Testi: Ürenin hidroliz edilip edilmediğini gösterir. Üreaz enzimine sahip *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler ortamdaki üreyi hidroliz ederek amonyak ve karbondioksit üretir. Amonyak ortam pH'sını alkalileştirir. Besiyerindeki turuncu olan fenol kırmızısının rengi pembeye dönüşür (38).

Test için Chrintensen urea broth kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan besiyeri, içindeki ürenin sıcağa dayanmaması nedeniyle 0.45 µm pora sahip bakteriyolojik bir filtreden süzülerek steril edildi ve steril deney tüplerine birer mililitre olarak bölüştürüldü. Testi yapılacak organizmadan 1-2 koloni ekildi ve 35˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Rengin pembe olması pozitif, değişmemesi negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella pneumoniae* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.

f. TSI Agarda Üreme Özelliği: TSI Agarda *Enterobacteriaceae* üyelerinin glukoz ve laktoz veya sükrozu fermentatif olarak kullanıp kullanamadığı ve hidrojen sulfit gazı oluşturup oluşturamadığı incelenir (38).

TSI agar üretici firmanın tarifine uyularak hazırlandı, otoklavlandıktan sonra yatık olarak katılaştırıldı. Testi yapılacak bakteriler agar yüzeyine öze yardımıyla ekildi ve iğne öze yardımıyla besiyerinin dip kısmına bakteriler gönderildi ve kapak gevşetilip 35˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Yatık yüzey ve dip sarı renkli ise laktozu kullandığı, dolayısıyla laktoz pozitif olarak, yatık kırmızı dip sarı ise laktozun kullanılamadığı dolayısıyla laktoz negatif olarak değerlendirildi. Tüpün dip kısmında siyah bir renk varsa H_2S gazının üretildiği sonucuna varıldı. Besiyeri ile tüpün camı arasındaki hava kabarcıkları fermantasyon sonucu karbondioksit gazı

üretimi olarak değerlendirildi. Laktoz pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu ve laktoz negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Shigella* spp. kullanıldı.

3.2.2. Ampisiline Dirençli Enterobakterilerin Seçilmesi ve Saklanması

İdentifiye edilmiş bakterilerinden *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)'ına (17) göre ≥32µg/ml ampisilin direnci olan izolatlar seçilerek çalışmada kullanıldı. Bunun için EMB agardan steril otomatik pipet ucu ile tek bakteri kolonisi alınarak gevşek kapaklı deney tüplerinde ≥32 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB buyyona ekildi. Çalkalayıcılı bir enkübatörde atmosferik ortamda 37˚C' de 18-20 saat 225 rpm de üretildi. Üreyebilen bakteriler ampisiline dirençli olarak değerlendirildi. Daha sonraki deneyler yapılana kadar % 20 gliserol ortamında –20˚C' de bir derin dondurucuda saklandı. Üreyemeyen bakteriler çalışma dışı bırakıldı.

3.2.3. Enterobakterilerin ve Transkonjugantlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Testlerinin Yapılması

Antimikrobiyal hassasiyet testleri *NCCLS* (17) kriterlerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve değerlendirildi.

Bu çalışmada, inhibitörlü β-laktamlardan, amoksisilin/klavulanat (Amc, 20µg/10µg); I. Kuşak sefalosporinlerden sefazolin (Cz, 30µg); II. Kuşak sefalosporinlerden sefuroksim (Cxm, 30µg); III. Kuşak sefalosporinlerden seftazidim (Caz, 30µg), sefotaksim (Ctx, 30µg) ve seftriakson (Cro, 30µg); IV. Kuşak sefalosporin sefepim (Fep, 30µg); monobaktam olarak aztreonam (Azt, 30µg); aminoglikozid grubundan amikasin (Ak, 30µg), gentamisin (Cn, 10µg), ve netilmisin (Net, 30 µg); tetrasiklin (Te, 30µg); trimetoprim/sulfametoksazol (Sxt, 1.25 µg/23.75 µg); kloramfenikol (C, 30 µg) diskleri kullanıldı.

Logaritmik üreme fazına kadar LB buyyonda üretilen enterobakteriler steril distile su veya steril serum fizyolojik kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklık serisine

(% 1.175 $BaCl_2.2H_2O$ çözeltisinden 0.5 ml ile %1 H_2SO_4 çözeltisinden 99.5 ml karıştırılarak hazırlandı) uyacak şekilde sulandırıldı. Bu bulanıklık düzeyinde yaklaşık olarak $1.5x10^8$ bakteri/ml bakteri olduğu varsayıldı. Üretici firmanın tarifine göre hazırlanıp steril cam petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller Hinton agar (pH 7.2-7.4) yüzeyi kurutuldu. Ucu pamuklu steril bir eküvyon, bulanıklığı ayarlanmış kültüre batırılıp bakteriler Mueller Hinton agar yüzeyine ekildi. Plaklar her defasında 60˚ döndürülerek agar yüzeyinde ekim yapılmamış yer kalmayacak şekilde işlem iki kez daha yinelendi. Son basamakta eküvyon, plağın kenarlarında çepeçevre gezdirilerek inokülasyon işlemi tamamlandı. Ekim yapıldıktan sonra agar yüzeyi tekrar kurutuldu. Dört derece sıcaklıkta saklanmakta olan antibiyotik diskleri alınarak agar yüzeyine temas edecek şekilde ve disk aralarında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. Çapı 150 mm'lik plaklara en fazla 12 disk, 100 mm'lik plaklara en fazla 5 disk yerleştirildi. Disklerin yerleştirilmesinden 15 dak sonra plaklar kapakları alta gelecek şekilde 35˚C' ye ayarlanmış etüve koyuldu. Kültürler 16-18 saat atmosferik ortamda enkübe edildikten sonra değerlendirildi.

Çıplak göz ile değerlendirilerek tam inhibisyonun gözlendiği alanın çapı (disk çapı dahil) bir cetvel yardımıyla ölçüldü. İnhibisyon sınırı çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edildi. *Proteus* türlerinde bazı disklerin inhibisyon zonu içine doğru buğu şeklindeki üremesi dikkate alınmadı. Ölçülen zon çapları *NCCLS* kitapçığındaki *Enterobacteriaceae* ile ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı", "orta derecede duyarlı" veya "dirençli" olarak değerlendirildi. *NCCLS* kriterlerine uyularak kullanılan Mueller Hinton agar, antibiyotik diskleri ve yapılan deneyin geçerliliğini göstermek için kontrol bakteri suşu olarak *E. coli* ATTC 25922 suşu kullanıldı. Ayrıca konjugasyonda alıcı hücre olarak kullanılan *E. coli* J53-2, kullanılan bütün antibiyotiklere hassas olduğu için ikinci bir kontrol suş olarak seçildi.

3.2.4. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile GSBL Tayini

Ampisiline dirençli bakterilerde GSBL üretiminin gösterilmesi Jarlier ve ark.(39)'nın önerileri doğrultusunda ÇDST ile yapıldı. Kontrol suş olarak GSBL üreten *E. coli* J53 [pUD18 (SHV-3 geni)] kullanıldı.

GSBL üretimi test edilecek enterobakteriler 3.2.3'te tarif edildiği gibi antibiyogram agarlarına ekildi. İndikatör β-laktamlar olarak seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam ve sefepim diskleri ile inhibitör kaynağı olarak amoksisilin/klavulanat diski kullanıldı. Standartlara uygun olarak Mueller Hinton agara testi yapılacak bakteri ekildikten sonra besiyerinin ortasına amoksisilin/klavulanat diski yerleştirildi. Disk çevresine merkezden merkeze uzaklıkları 30 mm olacak şekilde seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam ve sefepim diskleri yerleştirildi. Agarlar 35˚C' de atmosferik ortamda 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam veya sefepim disklerinin inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanat diskine doğru belirgin olarak genişlemesi ya da disk arasında üremenin inhibe olduğu bir alanın görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Şekil 11). Yalancı negatiflikleri önlemek için gerektiğinde diskler arası mesafe 20-25 mm'ye indirilerek test tekrarlandı.

3.2.5. Konjugasyon ile Plazmid DNA Transferi

Plazmid transfer deneylerinde verici hücre olarak ampisilin dirençli enterobakteriler, alıcı hücre olarak *E. coli* J53-2 (F^-) suşu kullanıldı. Konjugasyon Rice ve ark. (40)'nın önerilerine göre yapıldı.

Verici ve alıcı hücreler antibiyotik içermeyen 3 ml LB buyyona aynı miktarda inoküle edildiler. Çalkalayıcılı bir inkübatörde 37˚C' de 18-24 saat atmosferik ortamda üretildiler. Verici ve alıcı hücreleri içeren kültürler eşit hacimde (1:1) karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığı ve 35˚C' ye ayarlı etüvde 18-20 saat sallanmadan inkübe edildiler.

Transkonjugantların seleksiyonu için alıcı hücre *E. coli* J53-2'nin dirençli olduğu rifampisin (150 µg/ml) ve verici hücrenin dirençli olduğu ampisilin (50 µg/ml) eklenmiş EMB agar yüzeyine konjugasyon karışımının 10^{-1} dilüsyonundan otomatik pipet yardımıyla 100 µl damlatıldı. Steril cam baget yardımıyla agar yüzeyine iyice yayılarak 18-24 saat enkübe edildi. Metalik mavi-yeşil röfleli koloniler fenotipik olarak transkonjugant olarak varsayılıp taze ve yukarıdaki antibiyotikleri içeren EMB agara pasajlandılar. Aynı fenotipte üreyen bakteri kolonilerinin aşağıda ifade edilen 4 farklı içeriğe sahip selektif agarlara replika ekimleri yapıldı:

Agar 1: Alıcı hücre olan *E. coli* J53-2'nin oksotrof olduğu methionin ve prolin amino asitlerinden sadece birini içeren minimal agar.

Agar 2: 150 µg/ml rifampisin+50µg/ml ampisilin içeren EMB agar plağı.

Agar 3: 150 µg/ml rifampisin içeren EMB agar plağı.

Agar 4: 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar plağı.

Agar 1'de üremeyen, Agar 2, 3 ve 4'te üreyen fenotipik olarak metalik yeşil röfleli kolonilerin transkonjugant olduklarına karar verildi. Transkonjugantlardan tekrar plazmid DNA'ları izole edilerek plazmid transferi doğrulandı. Konjugasyon etkinliğinin (efficiency) hesap edilmesinde gereken canlı verici hücre sayısının bulunması için önceden 10^{-5}, 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonları yapılarak 100 µl'si LB agar yüzeyine damlatıldı ve steril bir cam baget yardımıyla yayılarak ekildi. Üreyen bakteri kolonileri sayılarak bulunan değer, ekilen miktar (ml) ile sulandırım katsayısı çarpımına aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı ve canlı bakteri sayısı belirlendi:

Canlı Bakteri Sayısı (ml'de) = Agardaki Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (ml) X *Sulandırım Katsayısı*

Verici suşların konjugasyon etkinliğinin hesabı için ilk izolasyon plaklarındaki transkonjugant kolonileri sayıldı ve mililitredeki transkonjugant sayısı hesaplanarak verici hücre kültürlerinin mililitresindeki hücre sayısına, aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı:

Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (ml'de) / Verici Hücre Sayısı (ml'de)

3.2.6. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid purifikasyon işlemlerinde alkali lizis miniprep yöntemi (41) bazı modifikasyonlarla kullanıldı.

Beş ml taze LB sıvı besiyerine tek koloni bakteri ekildi ve 37˚C' ye ayarlanmış çalkalayıcı enkübatörde 250 rpm'de bir gece enkübe edildi. Kültürün 1.5 ml'si steril Eppendorf tüplere transfer edilerek mikrosantrifüjde 13.000 rpm'de 1 dak çöktürüldü. Süpernatan kısmının tamamı pelete zarar verilmeden atıldı. Pelet 200 µl 4˚C' de saklanan soğuk solüsyon I içinde vorteks yardımıyla yeniden çözüldü ve 5-10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Taze hazırlanmış solüsyon II'den 200 µl eklendi ve tüp dikkatli bir şekilde alt-üst edilerek bakterilerin lizis olması sağlandı. Rengin açılması ve karışımın viskoz hale dönüşmesinin gözlenmesiyle lizisin gerçekleştiği sonucuna varıldı. Lizis karışımı buz üzerinde 5–10 dk bekletildi. Lizis karışımı üzerinde buzda soğutulmuş denatürasyon solüsyonu solüsyon III' ten 200 µl eklendi. Denatürasyonun oluşmasını hızlandırmak için tüp dikkatlice alt-üst edildi. Karışım mikrosantrifüjde 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Plazmidlerin bulunduğu süpernatan temiz bir Eppendorf tüpe otomatik mikro pipet yardımıyla transfer edildi. Üzerine süpernatanın iki kat hacminde 37˚C' ye ısıtılmış guanidin solüsyonu eklendi. Guanidin solüsyonu içinde bulunan diatomaceous earth (diatom toprağı) kolaylıkla çökelebildiği için solüsyon kullanılmadan önce sert bir şekilde çalkalandı. Pozitif yüklü diatom toprağının negatif yüklü olan plazmid DNA'larını bağlaması için alt-üst edilerek oda sıcaklığında 15-20 dk bekletildi. Bir mini-column alınarak pistonu çıkarılmış ucu vidalı bir enjektöre vidalandı ve karışım daha sonra enjektörün haznesine otomatik mikro pipet yardımıyla transfer edildi. Enjektörün pistonu takılarak diatom toprağı/DNA kompleksini içeren guanidin karışımı mini-columndan dikkatlice ve yavaşça süzüldü. Enjektör mini-columndan ayırtıldı ve pistonu çıkarılarak tekrar mini-columna vidalandı. Üzerinden iki kere 3 ml % 80 isopropanol geçirilerek filtre üzerindeki diatom toprağı/DNA kompleksi yıkandı. Tekrar enjektör columndan ayırtıldı ve temiz bir Eppendorf tüp üzerine koyuldu. Column taşıyan tüp mikrosantrifüje yerleştirilip 13.000 rpm'de 30-45 sn çevrilerek columnda kalan isopropanol atıldı. Mini-column temiz bir Eppendorf

tüpünün üzerine yerleştirildi ve DNA'ya 65˚C' ye ısıtılmış deiyonize sudan 30-70 µl eklenerek 1 dak santrifüj sonucu Eppendorf tüplere toplandı. Plazmid DNA agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

3.2.7. Plazmid DNA'larının *Eco*RI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Transkonjugantlarından izole edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzim analizi protokollerde tarif edilen yöntemler kullanılarak yapıldı (41).

*Eco*RI endonükleaz enzimi, restriksiyon analizlerinde üretici firmasının tariflerine göre kullanıldı. Toplam 30 µl hacimde 1-5 U/µg DNA olacak şekilde enzim kullanılarak kesim işlemi yapıldı. Reaksiyon karışımına 10x restriksiyon endonükleaz tamponundan 1x olacak şekilde (3 µl) eklendi. Artan volüm Dnase içermeyen steril deiyonize su ile tamamlandı. Reaksiyon karışımı 37˚C' ye ayarlanmış etüvde 1-2 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyonun başlangıcından 45 dk sonra kesimin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için karışımın bir miktarı (örneğin; 10 µl' si) temiz bir Eppendorf tüpe nakledildi ve reaksiyonu durdurmak için toplam hacmin % 20'si (2 µl) kadar yükleme (loading) tamponu ilave edilerek 65˚C' ye ayarlanmış benmaride 10 dk enzim inaktive edildi. İnaktivasyondan hemen sonra karışım % 0.6-0.8'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez edildi. Reaksiyon karışımının artan kısmı ise bu işlemler boyunca 37˚C' de inkübasyona devam etti. Agaroz jeldeki seperasyona bakılarak kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğine karar verildi. Kesim gerçekleşmişse etüvdeki diğer karışıma yukarıdaki inaktivasyon işlemi uygulandı ve karışım – 20˚C' de stoklandı. Kullanılacağı zaman tekrar 65˚C' de 10 dk ısı inaktivasyonu yapıldı.

3.2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi protokollerde tarif edilen yöntemler kullanılarak yapıldı (41).

Yöntemde kullanılan solüsyonlar 3.1.5'te gösterilmiştir. Plazmid DNA için TAE tamponu içinde % 0.6-0.8 yoğunluğunda, PCR ürünleri için % 2-3

yoğunluğunda agaroz jel kullanıldı. Plazmid DNA örneklerinden 5-10 µl alınarak yükleme tamponu (loading buffer) ile karıştırıldıktan sonra 40-120 Volt doğru akımda elektroforez edildi. Jel 0.5 µg/ml etidium bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole transillüminatöründe plazmid DNA paternleri gözlendi ve polaroid kamera ile görüntülendi.

3.2.9. Plazmid DNA'larının Moleküler Büyüklüklerinin Hesaplanması

Plazmidlerin moleküler büyüklüklerinin hesaplanması için *Eco*RI restriksiyon enzimi ile elde edilmiş fragmanları gösteren fotoğraf kullanıldı. Fotoğraf fotokopi ile 1:1 oranda büyütüldü. Jelin ilk veya son kuyucuğunda yürütülen *Hind*III ile kesilmiş, Lambda faj DNA fragmanları (23.1 kb, 9.4 kb, 6.6 kb, 4.5 kb, 2.3 kb ve 2.0 kb) semi-logaritmik kağıda aktarılarak elde edilen referans eğri kullanıldı. Bunun için semi-logaritmik kağıdın aksis (*x*) ekseni bantların kuyucuktan uzaklığı (cm), ordinat (*y*) ekseni ise moleküler büyüklük (baz çifti=bp) olarak belirlendikten sonra faj DNA fragmanları kuyucuktan itibaren uzaklıkları ölçüldü ve semi-logaritmik kağıtta moleküler ağırlığına karşı gelen yer nokta olarak işaretlendi. Bütün fragman aynı şekilde semi-logaritmik kağıtta işaretlendikten sonra bulunan noktalar birleştirilerek referans eğri elde edildi. Bu aşamadan sonra moleküler büyüklüğü hesaplanacak plazmidlerin restriksiyon fragmanları cetvel ile ölçüldü ve referans eğri ile kesiştiği noktanın ordinat eksenindeki değeri o bandın moleküler ağırlığı olarak belirlendi. Plazmidin bütün fragmanları bu şekilde hesaplanarak kaydedildi. Bütün fragmanların büyüklükleri toplanarak plazmidin moleküler büyüklüğü hesaplandı.

3.2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile β-Laktamaz Genlerinin Tiplendirilmesi

Polimeraz zincir reaksiyonları protokollerde tarif edildiği gibi optimize edilerek gerçekleştirildi (41).

Transkonjugantlar 3 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 20 saat 37˚ C' de sallayıcılı inkübatörde üretildiler. Kültürün 1.5 ml'si Eppendorf tüpüne alınarak 13.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Süpernatan atıldı ve pelet 500 µl deiyonize suda çözüldü. Hücreler 95˚C' de 10 dk ısıtılarak lizise uğratıldı. Debris, 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatanın 1 µl'si PCR' da kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı.

PCR toplam 50 µl'lik hacimde 200 µl hacimli mikro-tüplerde yapıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde yapıldı. Her bir primerden 20 *p*mol, 1X reaksiyon tamponu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, % 1 Triton-X-100), 0.2 mM her bir deoksinükleotid trifosfat (dNTP; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM $MgCl_2$ ve 1 U *Taq* polimeraz kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

TEM-tipi β-laktamaz geni (bla_{TEM}) ve SHV-tipi β-laktamaz genine (bla_{SHV}) spesifik intragenik amplifikasyon primerleri kullanılarak plazmid DNA'larında bulunan β-laktamaz geni TEM-tipi ve SHV-tipi olarak tiplendirildi. Bu genler için Arlet ve ark.'nın (42) önerdiği aşağıdaki primer çiftleri kullanıldı:

bla_{TEM} için; OT-1: 5'-TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA-3' (Pozisyon:320-339);
OT-2: 5'-TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA-3' (Pozisyon:804-823);
bla_{SHV} için; OS-1: 5'-TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT-3' (Pozisyon:301-320);
OS-2: 5'-AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG-3' (Pozisyon:907-926).

Amplifikasyon için siklüs parametreleri; TEM için ilk siklüs 94°C' de 10 dk denaturasyon, 26 döngü olan ikinci siklüs 94°C' de 2 dk denaturasyon, 54°C' de 1 dk primer bağlanması (annealing), 72°C' de 2 dk sentez (extension), son sentez siklüsü 72°C' de 7 dk ve 4°C' de saklama şeklinde yapıldı. SHV için; ilk siklüs 94°C' de 10 dk denaturasyon, 26 döngü olan ikinci siklüs 94°C' de 2 dk denaturasyon, 60°C' de 1 dk primer bağlanması (annealing), 72°C' de 2 dk sentez

(extension), son sentez siklüsü 72°C' de 7 dk ve 4°C' de saklama şeklinde yapıldı. Amplifikasyon sonucu 504 bp *bla*$_{TEM}$ PCR ürünü, 626 bp *bla*$_{SHV}$ PCR ürünü elde edildi (Şekil 12).

3.2.11. *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ –Spesifik Problar ile Plazmid DNA'larının Hibridizasyonu

Hibridizasyon deneylerinde kullanılacak olan *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ probları Arlet ve ark. (42)'nın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

bla$_{TEM}$-spesifik prob hazırlamak için, *E. coli* 7604 (TEM-1 geni) veya pBR322 (TEM-1 geni) plazmidlerinin kalıp olarak kullanıldığı TEM-spesifik PCR'la elde edilen 504 bp'lik ürün kullanıldı. *bla*$_{SHV}$-spesifik prob hazırlamak için, pUD18 (SHV-3 geni) plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı SHV-spesifik PCR'la elde edilen 626 bp'lik ürün kullanıldı.

PCR ürünleri Boehringer firmasının önerileri doğrultusunda digoxygenin (DIG) ile işaretlendi. Radyoaktif olmayan DIG, steroid yapıda bir haptendir. Alkalen ortamda denatüre olmaz, ancak kaynayan su banyosunda denatüre edilebilir. DNA probları DIG-11-dUDP ile rasgele işaretlenir (Random Primed Labelling Technique). Tüm hibridizasyon işlemleri Boehringer firmasının önerileri doğrultusunda yapıldı:

a. Probun İşaretlenmesi: Firmanın önerisine göre kitle 10 ng-3 µg DNA işaretlenebilmektedir. İşaretleme için toplam 16 µl hacimde 1 µg kalıp DNA (*bla*$_{TEM}$ veya *bla*$_{SHV}$ PCR ürünleri) alındı. Kaynar suda 10 dk denatüre edildi ve tüp hemen buz/etanol karışımına daldırılarak dairesel hareketlerle bir anda soğutuldu (chilling). Vial 1'deki (bkz. 3.1.7.-a) DIG-High Prime'dan 4 µl karışıma eklendi ve kısa bir santrifüjden sonra 37˚C' de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için 10 dk 65˚C' de bekletildi. Kullanılıncaya kadar –20˚C' de saklandı.

b. Agaroz Jel Elektroforezi ve Blotlama: *Eco* RI ile hazmedilmiş transkonjugantlardan izole edilmiş plazmidler % 0.6'lık agaroz jelde 45 volt doğru

akım altında 4 saat hazım paternleri iyice birbirinden ayrılana kadar yürütüldüler. Polaroid kamera ile jel fotoğraflandı.

Temiz bir plastik kutuya alınan jel 15 dk denaturasyon solüsyonunda (bkz.3.1.7-g) çalkalanmaya bırakıldı. İşlem bir kez daha tekrarlandı ve su ile yıkandı. İki kere 15'er dk nötralizasyon solüsyonunda (bkz. 3.1.7.-h) bırakıldı.

Blotlama için plastik bir kabın ortasına üstü keçeli ve düz, altı süngerden yapılmış bir bulaşık süngeri yerleştirildi ve kaba keçeyi aşmayacak şekilde 10 x SSC döküldü. Keçe üzerine kenarlardan 0.5 cm içerde kalacak şekilde ortası dikdörtgen şeklinde jelin boyutlarını biraz aşacak biçimde kesilerek çıkarılmış plastik bir tabaka yerleştirildi. Plastik tabaka ortasındaki boşluğa ince ve aynı boyutlarda kesilmiş bir Whatman 3 kağıdı 10x SSC ile ıslatılarak yerleştirildi. Nötralize edilmiş jel bu kağıdın üzerine dikkatlice ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jel boyutlarında kesilmiş ve 10 x SSC ile ıslatılmış naylon transfer membranı jelin üzerine çok dikkatli bir şekilde bir hamlede hava kabarcığı kalmayacak şekilde bırakıldı. Üzerine 2 kat halinde 10x SSC ile ıslatılmış Whatman 1 kağıdı konuldu. Daha sonra jel boyutunu 2-3 mm aşan kalın Whatman 3 kağıtlarından yaklaşık 10 cm olacak şekilde 15-20 tane yerleştirildi. En üste cam bir plaka yerleştirildi ve üzerine 0.5 kg ağırlık koyuldu. Bu haliyle oluşturulan blot düzeneği bir gece bırakıldı.

c. DNA Fiksasyonu: Ertesi gün transferin gerçekleştiğini göstermek için blotlanan jel etidium bromide içeren suda 15 dk boyandı ve 15 dk su ile renksizleştirildikten sonra UV transillüminatörde incelendi. DNA bantları görülmeyince transferin tam olarak gerçekleştiği kararına varıldı ve naylon membran Whatman 1 kağıdı arasına alınarak oda sıcaklığında kurutuldu ve 80˚C' ya ayarlı bir pastör fırınında 2 saat bırakılarak membrandaki DNA tespit edildi. Alüminyum folyö içine alınan membran diğer işlemlere geçene kadar 4˚C' de saklandı.

d. Prehibridizasyon: Membrandaki non-spesifik nükleik asit bağlayan bölgeleri kapatmak için prehibridizasyon yapıldı. Standart prehibridizasyon solüsyonu (bkz.

3.1.7-i) 10 dk kaynatılarak hemen buz/alkol karışımı içinde soğutuldu. Temiz kapaklı bir kaba dökülerek içine jelin blot edildiği transfer membranı koyuldu ve 42˚C' de sallanarak 6 saat inkübe edildi. Süre sonunda prehibridizasyon solüsyonu tekrar başka deneylerde kullanılmak üzere kapaklı bir tüpe alınarak –20˚C' de saklandı.

e. Hibridizasyon: DIG'le işaretli prob standart prehibridizasyon tamponuna karıştırıldı ve 10 dk kaynatılarak buz/etanol karışımında soğutuldu. Temiz kapaklı bir kaba döküldü ve prehibridizasyon işlemi yapılmış membran hibridizasyon solüsyonuna koyuldu. Yüksek *stringency* sıcaklıkta (68˚C' de) bir gece 60 rpm'de sallanarak inkübe edildi. Bir gece sonra prob içeren standart prehibridizasyon solüsyonu kapaklı bir tüpe alınarak başka deneylerde kullanılmak üzere –20˚C' de saklandı.

f. Posthibridizasyon Yıkamaları: İki kere 100 ml 2 x yıkama solüsyonunda (bkz. 3.1.7.-k) oda sıcaklığında sallayarak 5 dk membran yıkandı. Ardından, iki kere 0.1 SSC, % 1 SDS içeren 100 ml solüsyonda sallayarak 68°C' de 15 dk membran yıkandı.

g. Belirleme (detection) Prosedürü: Posthibridizasyon yıkamalarından sonra membran 5 dk maleic asid tamponuyla (bkz 3.1.7-l) sallanarak yıkandı. Yıkama sonrası 45 dk 50 ml 1x bloklama solüsyonunda (bkz. 3.1.7-m) enkübe edildi. Bloklama solüsyonunda (1x) 1:5000 oranında sulandırılmış 20 ml anti-DIG-AP konjugatında (bkz.3.1.7-a ve o) membran 30 dk sallanarak inkübe edildi. İki kere maleic asit yıkama tamponu (bkz. 3.1.7-p) ile 15 dk yıkandı. Yirmi ml deteksiyon tamponunda (bkz. 3.1.7-n) 5 dk bırakıldı. Membran son olarak 10 ml renk-substrat solüsyonunda (bkz. 3.1.7-q) 16 saat karanlık bir ortamda bantlar tam olarak belirene kadar bekletildi. Renk-substrat solüsyonu atıldı ve TE tamponu ile reaksiyon durduruldu. Membran ıslak olarak fotoğraflandı.

4.BULGULAR

4.1. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Tür Tayinleri

İzole edilen 176 enterobakterinin tür tayinleri için uygulanılan biyokimyasal test sonuçlarına göre % 53.40 *E. coli*, % 23.86 *Klebsiella* spp., %11.93 *Proteus* spp., % 9.65 *Enterobacter* spp. ve % 1.13 *Serratia* spp. izole edildi. İzolatların türlere göre dağılımı Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Türlerinin Dağılımı

Türler	**Türler**		**Toplam**	
	Sayı (n)	**Yüzde (%)**	**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**
E. coli	94	53.40	94	53.40
Klebsiella pneumoniae	21	11.93	42	23.86
Klebsiella oxytoca	14	7.95		
Klebsiella pneumoniae ssp. *ozaenae*	7	3.97		
Proteus mirabilis	19	10.79	21	11.93
Proteus vulgaris	2	1.13		
Enterobacter aerogenes	10	5.68	17	9.65
Enterobacter cloacae	4	2.27		
Enterobacter sakazakii	2	1.13		
Enterobacter agglomerans	1	0.56		
Serratia marcescens	2	1.13	2	1.13
TOPLAM	**176**		**176**	**100**

4.2. Ampisilin Dirençli (Amp^r) *Enterobacteriaceae* İzolatları

İzole edilen 176 *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin 133'ü NCCLS kriterlerine göre ampisiline dirençli bulundu (≥ 32µg/mL) ve moleküler epidemiolojik araştırma kapsamına alındı (Tablo 7).

Tablo 7. Ampisilin Direncinin Türlere Göre Dağılımı

Türler	Türlerin oranları		Amp^r	*Toplam Amp^r* **oranları**	
	Sayı (n)	**Yüzde (%)**		**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**
E. coli (n=94)	61	64.89		61	64.89
Klebsiella pneumoniae (n=21)	21	100			
Klebsiella pneumoniae ssp. *ozaenae* (n=7)	7	100		42	100
Klebsiella oxytoca (n=14)	14	100			
Proteus mirabilis (n=19)	9	47.36		11	52.38
Proteus vulgaris (n=2)	2	100			
Enterobacter aerogenes (n=10)	10	100			
Enterobacter cloacae (n=4)	4	100		17	100
Enterobacter sakazakii (n=2)	2	100			
Enterobacter agglomerans (n=1)	1	100			
Serratia marcescens (n=1)	2	100		2	100
TOPLAM (n=176)	**133**			**133**	**75.56**

Enterobakteriler arasında *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia*'ların hepsi (% 100) *E. coli* % 64.51 ve *Proteus* spp. % 52.38'i ampisiline dirençli bulundu. Çalışmadaki toplam 176 bakterinin 133'ü (% 75.56) ampisilin dirençli bulundu (Tablo 8).

4.3. Ampisilin Direncinin Konjugatif Transferi

Ampisilin dirençli 133 bakteri konjugasyon deneyine tabi tutuldu. Bunlardan 26 (% 19.54)'sının ampisilin direnç genlerini konjugasyonla *E. coli* J53-2'ye 10^{-4} ile 10^{-8} arasındaki etkinlikle transfer ettiği tespit edildi (Tablo 8).

Ampisilin dirençli 61 *E. coli*'den 13'ü (% 21.31), 21 *K. pneumoniae* 'dan 7'si (% 33.33), 7 *K. pneumoniae* spp. *ozaenae*'den 2'si (% 28.57), 14 *K. oxytoca*'dan 2'si (% 14.28) ve 10 *Enterobacter aerogene*s *(E. aerogene*s)'ten 2'si (% 20) konjugal transfer ile ampisilin direnç genlerini J53-2 suşuna aktardı.

E.cloacae, *E. sakazakii*, *E. agglomerans*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* ve *Serratia marcescens* türleri ampisilin direnç genlerini konjugasyonla *E. coli* J53-2'ye transfer etmedi.

Konjugasyon karışımının oda sıcaklığı ve 35˚C' de inkübe edilmesinde transfer etkinliği açısından fark bulunamadı.

Tablo 8. Verici Suşların Konjugasyon Etkinlikleri ve Transkonjugantları

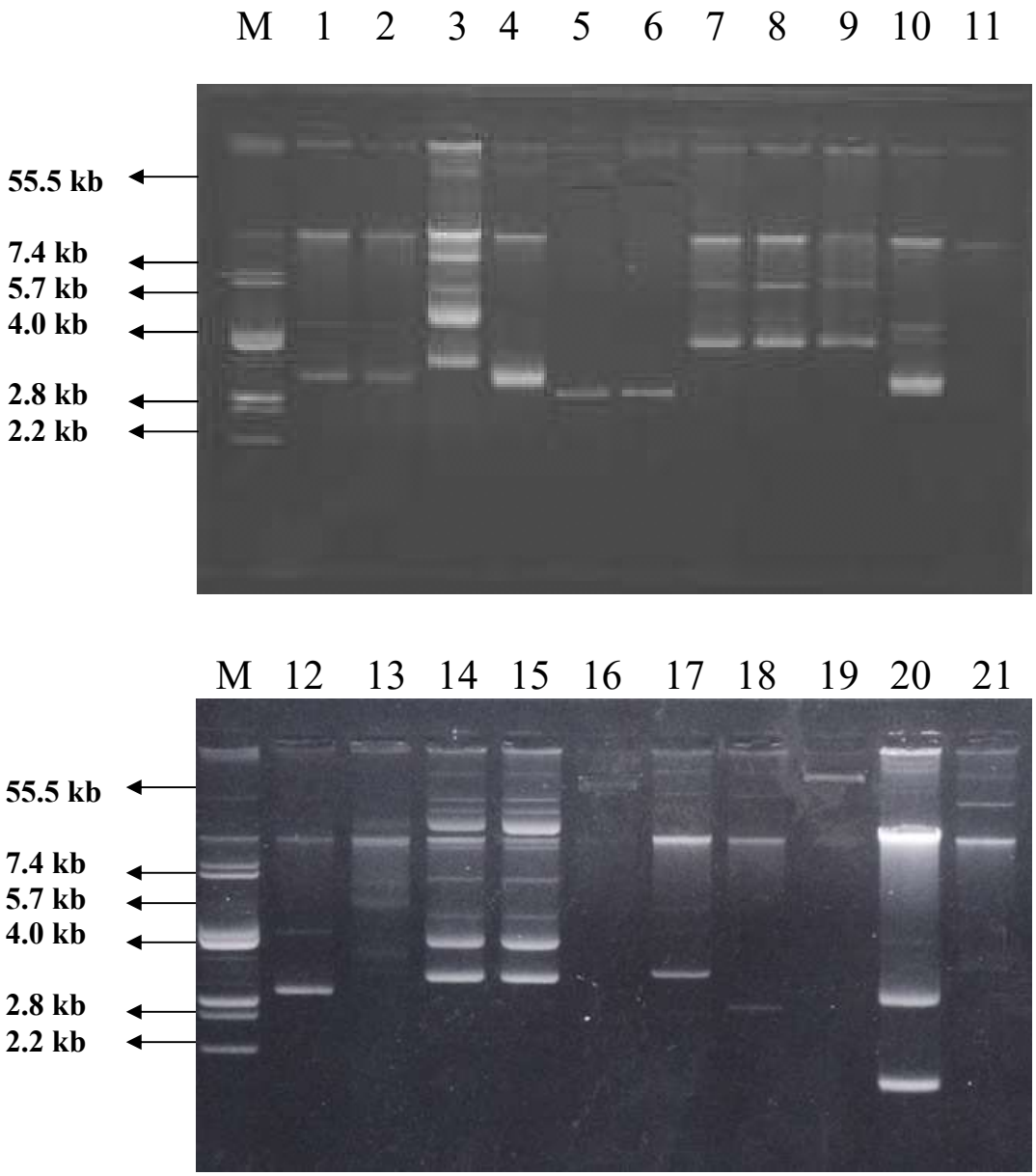
Verici Suşlar	*Transkonjugantlar*	**Konjugasyon Etkinliği**[a]
E. coli TRE056	*E. coli* J53-2 (pTRE56)	10^{-6}
E. coli TRE060	*E. coli* J53-2 (plazmid yok)	$3x10^{-7}$
E. coli TRE066	*E. coli* J53-2 (pTRE66)	$6x10^{-7}$
E. coli TRE073	*E. coli* J53-2 (pTRE73)	10^{-8}
E. coli TRE090	*E. coli* J53-2 (pTRE90)	10^{-7}
E. coli TRE092	*E. coli* J53-2 (pTRE92)	$5x10^{-7}$
E. coli TRE111	*E. coli* J53-2 (plazmid yok)	$3x10^{-7}$
E. coli TRE130	*E. coli* J53-2 (plazmid yok)	$5x10^{-6}$
E. coli TRE151	*E. coli* J53-2 (pTRE151)	$3x10^{-5}$
E. coli TRE153	*E. coli* J53-2 (pTRE153)	10^{-7}
E. coli TRE154	*E. coli* J53-2 (pTRE154)	10^{-7}
E. coli TRE157	*E. coli* J53-2 (pTRE157)	$3x10^{-6}$
E. coli TRE160	*E. coli* J53-2 (pTRE160)	10^{-4}
K. pneumoniae TRE025	*E. coli* J53-2 (pTRE025	$5x10^{-8}$
K. pneumoniae TRE037	*E. coli* J53-2 (pTRE37)	10^{-8}
K. pneumoniae TRE040	*E. coli* J53-2 (pTRE40)	10^{-7}
K. pneumoniae TRE044	*E. coli* J53-2 (pTRE44)	10^{-7}
K. pneumoniae TRE083	*E. coli* J53-2 (pTRE83)	$3x10^{-7}$
K. pneumoniae TRE146	*E. coli* J53-2 (pTRE146)	$4x10^{-5}$
K. pneumoniae TRE165	*E. coli* J53-2 (pTRE165)	$7x10^{-7}$
K. pneumoniae spp. *ozaenae* TRE141	*E. coli* J53-2 (plazmid yok)	$4x10^{-8}$
K. pneumoniae spp. *ozaenae* TRE173	*E. coli* J53-2 (pTRE173)	10^{-4}
K. oxytoca TRE063	*E. coli* J53-2 (pTRE63)	10^{-7}
K. oxytoca TRE082	*E. coli* J53-2 (pTRE82)	10^{-8}
E. aerogenes TRE088	*E. coli* J53-2 (pTRE88)	10^{-7}
E. aerogenes TRE164	*E. coli* J53-2 (pTRE164)	$4x10^{-7}$

[a]; oda sıcaklığı ve 35˚C' de

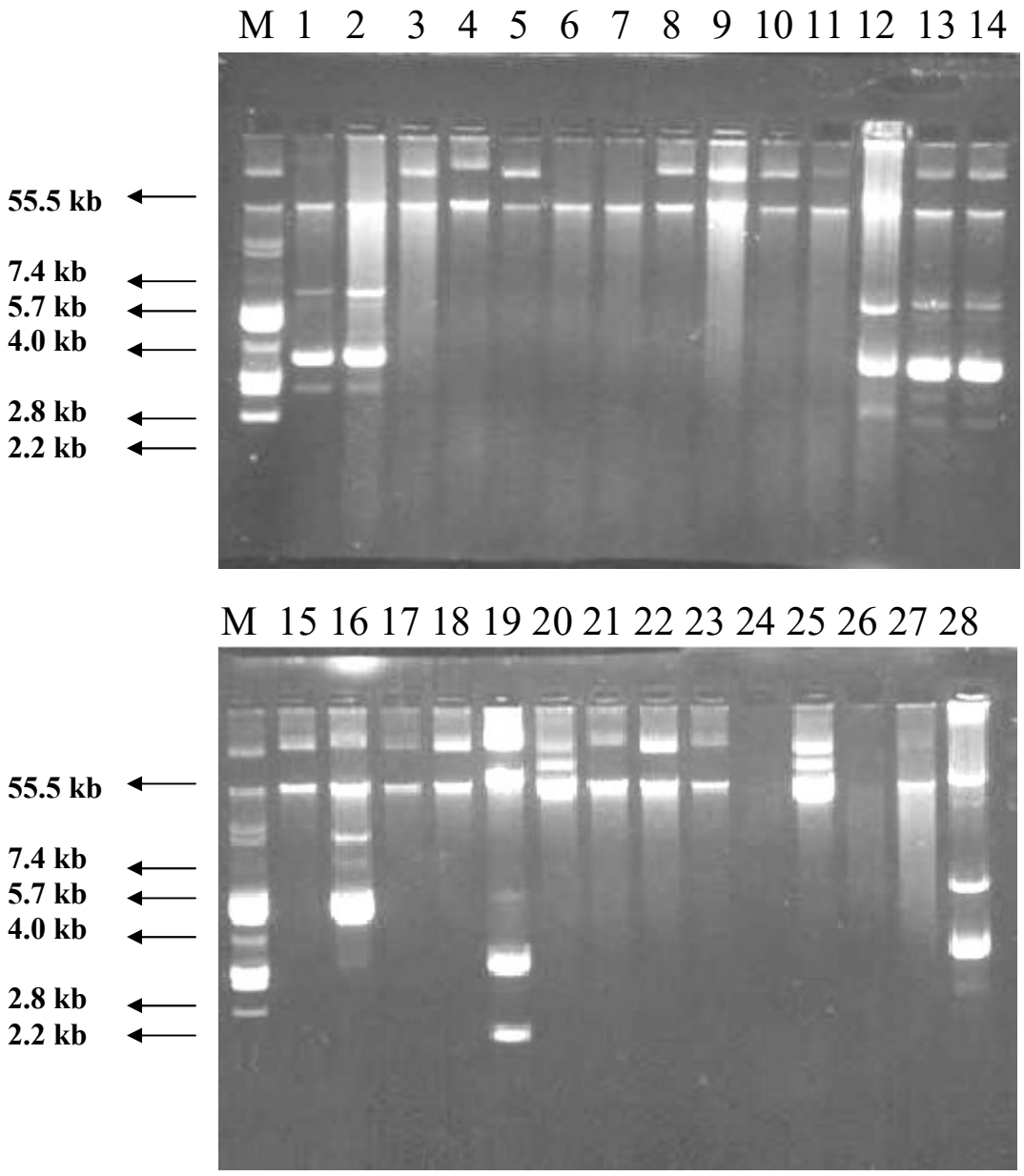
4.4. Epidemik ve Nonepidemik Plazmidlerin Belirlenmesi ve Gruplandırılması:

Şekil 9'da ampisilin direncini transfer eden 20 klinik suşun plazmidleri gösterildi. Yirmi altı transkonjugantın 24'ünden izole edilen plazmid DNA'larının (Şekil 10) 20'si *Eco*RI enzimi ile kesildi. Buna göre plazmidlerin (Şekil 11) moleküler büyüklükleri 6.7 kb ile 93.1 kb arasında bulundu. *E. coli* TRE060, *E. coli* TRE130 ve *K. pneumoniae* spp. *ozaenae* TRE141 suşlarının transkonjugantlarından plazmid izole edilemediği için çalışma dışı bırakıldı. pTRE111, pTRE132, pTRE151 ve pTRE173 plazmidleri *Eco*RI enzimi ile kesilemedi ve çalışma dışı bırakıldı.

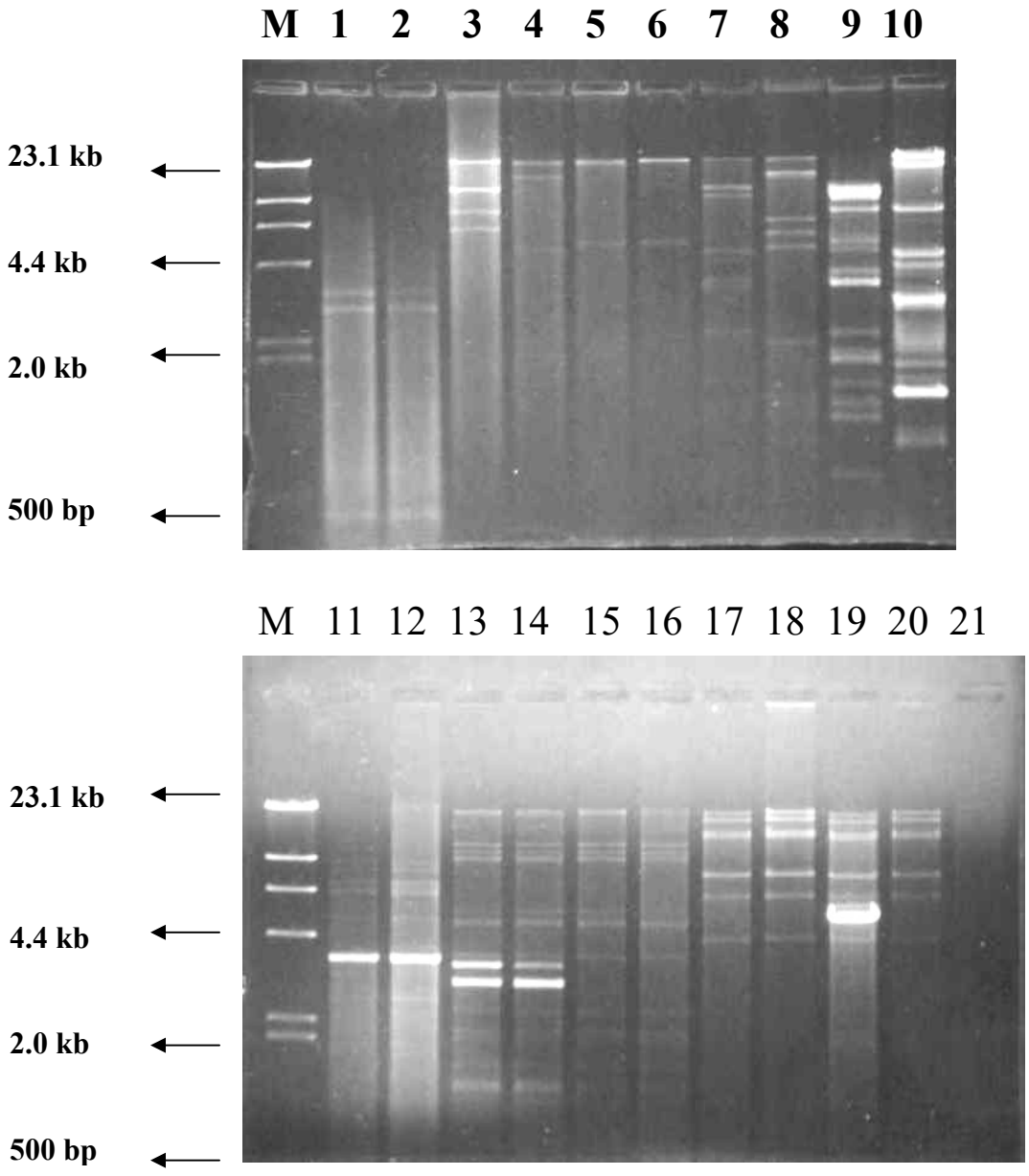
Molekül büyüklükleri hesaplanan 20 plazmid A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K ve L olarak gruplandırıldı (Tablo 9). Restriksiyon enzim paternleri değerlendirilerek A, B, C, D ve E grupları kendi aralarında epidemik, F, G, H, I, J, K ve L grupları nonepidemik plazmidler olarak gruplandırıldı.



Şekil 9. Klinik Suşlardan İzole Edilmiş Plazmid DNA'ları. **M; *E. coli* V517, 1; *K. pneumoniae* TRE025 (pTRE25), 2; *K. pneumoniae* TRE037 (pTRE37), 3; *K. oxytoca* TRE063 (pTRE63), 4; *E. aerogenes* TRE164 (pTRE164), 5;*E. aerogenes* TRE088 (pTRE88), 6*; *E. coli* TRE090 (pTRE90), 7; *K. pneumoniae* (pTRE165), 8; *K. pneumoniae* (pTRE44), 9; *E. coli* TRE153 (pTRE153), 10; *K. pneumoniae* TRE083 (pTRE83), 11; *E. coli* TRE092 (pTRE92), 12; *K. pneumoniae* TRE040 (pTRE40), 13; *E. coli* TRE073 (pTRE73), 14; *E. coli* TRE154-1 (pTRE154-1), 15; *E. coli* TRE154-2 (pTRE154-2), 16; *K. oxytoca* TRE082 (pTRE82), 17; *K. pneumoniae* TRE146 (pTRE146), 18; *E. coli* TRE160 (pTRE160), 19; *E. coli* TRE066 (pTRE66), 20; *E. coli* TRE157 (pTRE157), 21; *E. coli* TRE056 (pTRE56).**



Şekil 10. Transkonjugantlardan İzole Edilmiş Plazmid DNA'ları. M; *E. coli* V517, 1; pTRE25, 2; pTRE37, 3; pTRE40, 4; pTRE44, 5; pTRE56, 6; pTRE60-1, 7; pTRE60-2, 8; pTRE63, 9; pTRE66, 10; pTRE73, 11; pTRE82, 12; pTRE83, 13; pTRE88, 14; pTRE90, 15; pTRE173, 16; pTRE165, 17; pTRE164, 18; pTRE160, 19; pTRE1157, 20; pTRE154-1, 21; pTRE153, 22; pTRE151, 23; pTRE146, 24; pTRE141, 25; pTRE154-2, 26; pTRE130, 27; pTRE111, 28; pTRE92.



Şekil 11. Transkonjugantlardan İzole Edilmiş Plazmidlerin *Eco*RI Kesimleri. M; *Hind* III ile Lambda faj DNA'sı, 1; pTRE83, 2; pTRE92, 3; pTRE66, 4; pTRE82, 5; pTRE40, 6; pTRE73, 7; pTRE146, 8; pTRE160, 9; pTRE154, 10; pTRE157, 11; pTRE25, 12; pTRE37, 13; pTRE88, 14; pTRE90, 15; pTRE63, 16; pTRE164, 17; pTRE44-1, 18; pTRE153, 19; pTRE165, 20; pTRE44-2, 21; pTRE56.

Tablo 9. Plazmidlerin Moleküler Büyüklükleri ve Gruplandırılması

Plazmidler	Verici suşu	Moleküler Büyüklüğü (kb)	Gruplandırma
pTRE25	*K. pneumoniae* TRE025	73.2	A
pTRE37	*K. pneumoniae* TRE037	73.2	A
pTRE63	*K. oxytoca* TRE063	70.3	B-1
pTRE164	*E. aerogenes* TRE164	70.3	B-1
pTRE88	*E. aerogenes* TRE088	73.3	B-2
pTRE90	*E. coli* TRE090	73.3	B-2
pTRE165	*K. pneumoniae* TRE165	93.1	C-1
pTRE44	*K. pneumoniae* TRE044	87.8	C-2
pTRE153	*E. coli* TRE153	87.8	C-2
pTRE83	*K. pneumoniae* TRE083	6.7	D
pTRE92	*E. coli* TRE092	6.7	D
pTRE40	*K. pneumoniae* TRE040	27.4	E
pTRE73	*E. coli* TRE073	27.4	E
pTRE154	*E. coli* TRE154	48.5	F
pTRE82	*K. oxytoca* TRE082	39	G
pTRE146	*K. pneumoniae* TRE146	58.6	H
pTRE160	*E. coli* TRE160	62.5	I
pTRE66	*E. coli* TRE066	53.3	J
pTRE157	*E. coli* TRE157	73	K
PTRE56	*E. coli* TRE56	30	L

Plazmid gruplarını taşıyan enterobakterilerin izole edildiği materyaller ve sağlandığı hastane birimleri Tablo 10'de gösterildi.

Tablo 10. Konjugatif Plazmidleri Taşıyan Suşların İzole Edildiği Materyaller ve Sağlandığı Hastane Üniteleri

Plazmid	Grubu	Taşındığı Suşun İzole Edildiği Materyal	Materyalin Sağlandığı Hastane Ünitesi
pTRE25	A	Trakeal Aspirat	Pediatri Yoğun Bakım
pTRE37	A	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
pTRE63	B-1	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
pTRE164	B-1	Trakeal Aspirat	Enfeksiyon Servisi
pTRE88	B-2	İdrar	Pediatri Polikliniği
pTRE90	B-2	İdrar	Pediatri Polikliniği
pTRE165	C-1	Trakeal Aspirat	Pediatri Yoğun bakım
pTRE44	C-2	İdrar	Pediatri Süt Çocuğu Servisi
pTRE153	C-2	Trakeal Aspirat	Pediatri Yoğun Bakım
pTRE83	D	İdrar	Pediatri Polikliniği
pTRE92	D	İdrar	Pediatri Polikliniği
pTRE40	E	İdrar	Pediatri Adelosan Servisi
pTRE73	E	Kan	Pediatri Yoğun Bakım
pTRE154	F	BOS	Pediatrik Cerrahi Servisi
pTRE82	G	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
pTRE146	H	İdrar	Pediatrik Cerrahi Polikliniği
pTRE160	I	İdrar	Pediatrik Cerrahi Servisi
pTRE66	J	İdrar	Dahiliye Servisi-I
pTRE157	K	İdrar	Pediatri Polikliniği
PTRE56	L	İdrar	Pediatri Polikliniği

Servis ve yoğun bakım ünitelerinde konjugatif 20 plazmidin 5'i (% 23.80) pediatrik cerrahi servisinde (PCS), 4'ü (% 19.04) pediatri yoğun bakımda (PYB), 1'i (% 4.76) pediatri süt çocuğu servisinde (PSS), 1'i (% 4.76) pediatri adelosan servisinde (PAS), 1'i (% 4.76) enfeksiyon servisinde (ES) ve 1'i dahiliye servisi-I' nde (DS-1) yatan hastalardaki enfeksiyon etkeni bakterilerden; poliklinik hastalarından 6'sı (% 28.57) pediatri polikliniğine (PP), 1'i (% 4.76) pediatrik

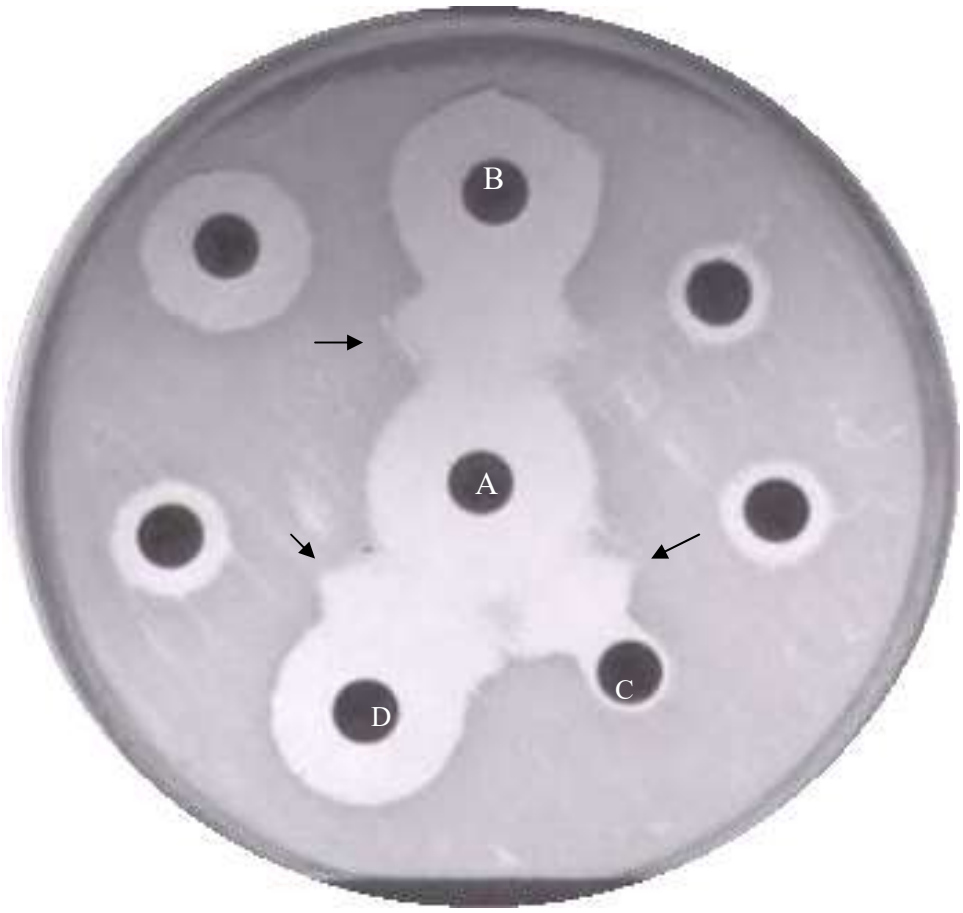
cerrahi polikliniğine (PCP) başvuran hastalardaki enfeksiyon etkeni enterobakterilerden izole edildi (Tablo 11).

Tablo 11. Epidemik ve Nonepidemik Konjugatif Plazmid Gruplarının Hastane Ünitelerine Dağılımı

Plazmid Grupları	Hastane Ünitelerinde Ortaya Çıkma Oranı							
	PYB	**PCS**	**PAS**	**PSS**	**ES**	**DS-I**	**PP**	**PCP**
A (n=2)	1	1						
B (n=4)		1			1		2 (B-2)	
C (n=3)	2 (C-2)			1 (C-1)				
D (n=2)							2	
E (n=2)	1		1					
F (n=1)		1						
G (n=1)		1						
H (n=1)								1
I (n=1)		1						
J (n=1)						1		
K (n=1)							1	
L (n=1)							1	
Toplam (n=20)	4	5	1	1	1	1	6	1

4.5. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Epidemik ve nonepidemik plazmidleri transfer edebilen suşlar ve plazmidlerini taşıyan transkonjugantlarda GSBL'lerin belirlenmesi için yapılan ÇDS testlerinde suşlar ve transkonjugantların hepsi pozitif sonuç verdi (Tablo 12). Şekil 12'de DDS testi örnek olarak gösterildi.



Şekil 12. GSBL Üreten *E. coli* TRE090'nın ÇDS Testi.

A)Amoksisilin/klavulanat, (B) Seftazidim, (C) Aztreonam, (D) Sefepim. Diğerleri β-laktam olmayan antibiyotik diskleri. Oklar β-laktamın inhibitör etkisinin klavulanat ile artırıldığını göstermektedir.

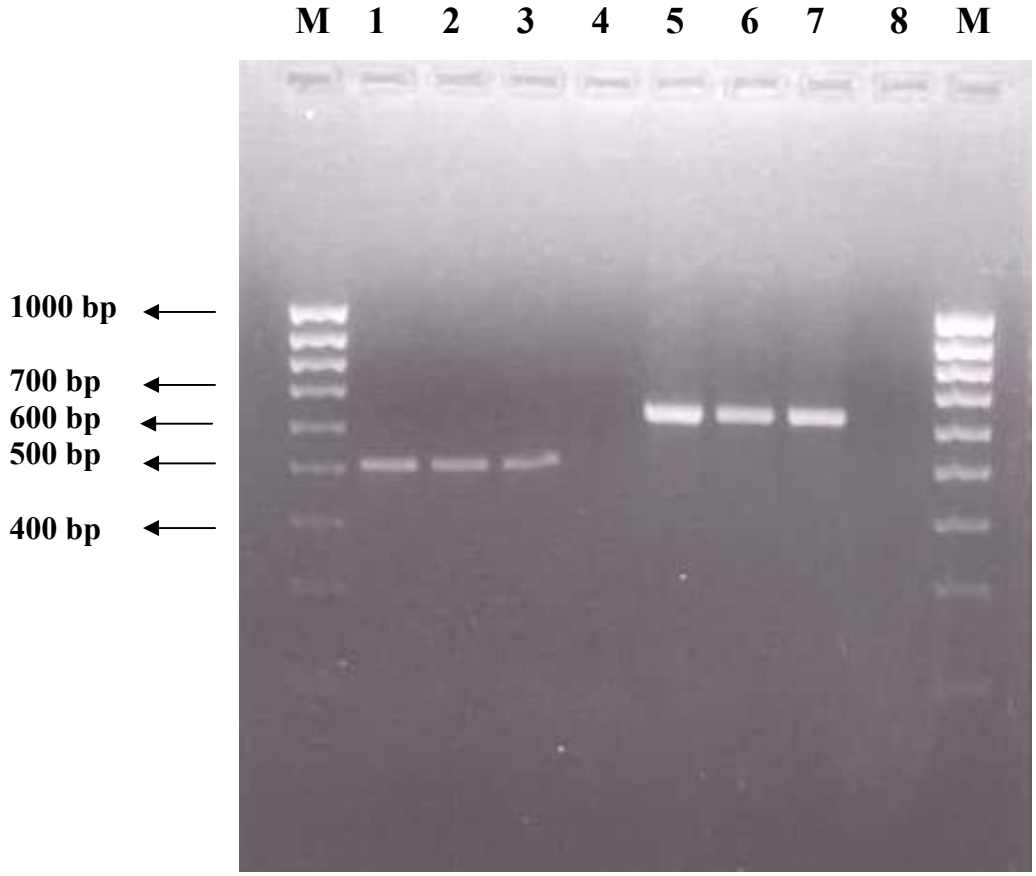
Ampisilin dirençli 61 *E. coli*'den 13'ünün (%21.31), 42 *Klebsiella* spp.'den 11'inin (%26.19) ve 17 *Enterobacter* spp.'den 2'sinin (% 11.76) GSBL ürettiği belirlendi. Tablo 12'de plazmid analizleri yapılabilen 20 GSBL üreten suş ve transkonjugantları gösterildi. Ampisilin dirençli 133 enterobakteri türü içinde 26 (% 19.54)'sında GSBL pozitifliği saptandı.

Tablo 12. Verici Suşlar ve Transkonjugantlarının ÇDS Test Sonuçları

Verici Suşlar	**GSBL**	*Transkonjugantlar*	**GSBL**
K. pneumoniae TRE025	+	J53-2 (pTRE25)	+
K. pneumoniae TRE037	+	J53-2 (pTRE37)	+
E. aerogenes TRE088	+	J53-2 (pTRE88)	+
E. coli TRE090	+	J53-2 (pTRE90)	+
K. oxytoca TRE063	+	J53-2 (pTRE63)	+
E. aerogenes TRE164	+	J53-2 (pTRE164)	+
K. pneumoniae TRE044	+	J53-2 (pTRE44)	+
E. coli TRE153	+	J53-2 (pTRE153)	+
K. pneumoniae TRE165	+	J53-2 (pTRE165)	+
K. pneumoniae TRE083	+	J53-2 (pTRE83)	+
E. coli TRE092	+	J53-2 (pTRE92)	+
K. pneumoniae TRE040	+	J53-2 (pTRE40)	+
E. coli TRE073	+	J53-2 (pTRE73)	+
E. coli TRE154	+	J53-2 (pTRE154)	+
K. oxytoca TRE082	+	J53-2 (pTRE82)	+
K. pneumoniae TRE146	+	J53-2 (pTRE146)	+
E. coli TRE160	+	J53-2 (pTRE160)	+
E. coli TRE066	+	J53-2 (pTRE66)	+
E. coli TRE157	+	J53-2 (pTRE157)	+
E. coli TRE56	+	J53-2 (pTRE56)	+

4.6. Transkonjugantlarda TEM- ve SHV-Tip β-Laktamaz Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

TEM-spesifik primerlerin (OT-1 ve OT-2) spesifikliğinin kontrolü için *E. coli* [7604 (TLE-1, TEM-1 genleri)] veya *E. coli* JM109 [pBR322 (TEM-1 geni)] ve *E. coli* J53 [RP4 (TEM-2 geni)] suşlarını kullanarak 504 bp'lik bla_{TEM} PCR ürünü ve SHV-spesifik primerlerin (OS-1 ve OS-2) spesifikliğinin kontrolü için *E. coli* J53 [pUD18 (SHV-3 geni)] suşu kullanılarak 626 bp'lik bla_{SHV} PCR ürünü elde edildi (Şekil. 13).



Şekil 13. bla_{TEM} ve bla_{SHV} Genlerinin PCR ile Analizi. M; 100 bp DNA Ladder, 1; *E. coli* 7604 (TEM-1) pozitif bla_{TEM}, 2-3; bla_{TEM} pozitif A grubu plazmidler (pTRE25 ve pTRE37), 4; Ampisiline hassas *E. coli* J53-2 negatif kontrol, 5; pUD18 (bla_{SHV-3}) pozitif kontrol, 6-7; bla_{SHV} pozitif E grubu plazmidler (pTRE40 ve pTRE73), 8; Ampisiline hassas *E. coli* V517 (negatif kontrol).

Plazmid gruplarından A, B, C, F ve G grubu plazmidlerin TEM ve SHV-türevi genlerin ikisini de, E, H, I, J ve K grubu plazmidlerin sadece SHV-türevi genleri, D ve L grubu plazmidlerin ise TEM veya SHV-türevi genlerden hiçbirini kodlamadığı belirlendi (Tablo. 13).

Tablo 13. Epidemik ve Nonepidemik Plazmid Gruplarında TEM veya SHV-Türevi β-Laktamaz Dağılımı

Verici Suşlar	Transkonjugantlar	Plazmidinin Grubu	TEM-Türevi	SHV-Türevi
K. pneumoniae TRE025	J53-2 (pTRE25)	A	+	+
K. pneumoniae TRE037	J53-2 (pTRE37)	A	+	+
K. oxytoca TRE063	J53-2 (pTRE63)	B-1	+	+
E. aerogenes TRE164	J53-2 (pTRE164)	B-1	+	+
E. aerogenes TRE088	J53-2 (pTRE88)	B-2	+	+
E. coli TRE090	J53-2 (pTRE90)	B-2	+	+
K. pneumoniae TRE165	J53-2 (pTRE165)	C-1	+	+
K. pneumoniae TRE044	J53-2 (pTRE44)	C-2	+	+
E. coli TRE153	J53-2 (pTRE153)	C-2	+	+
K. pneumoniae TRE083	J53-2 (pTRE83)	D	-	-
E. coli TRE092	J53-2 (pTRE92)	D	-	-
K. pneumoniae TRE040	J53-2 (pTRE40)	E	-	+
E. coli TRE073	J53-2 (pTRE73)	E	-	+
E. coli TRE154	J53-2 (pTRE154)	F	+	+
K. oxytoca TRE082	J53-2 (pTRE82)	G	+	+
K. pneumoniae TRE146	J53-2 (pTRE146)	H	-	+
E. coli TRE160	J53-2 (pTRE160)	I	-	+
E. coli TRE066	J53-2 (pTRE66)	J	-	+
E. coli TRE157	J53-2 (pTRE157)	K	-	+
E. coli TRE56	J53-2 (pTRE56)	L	-	-

GSBL üreten 20 enterik bakteri suşu arasında *E. coli*'den 3'ünün (% 15) TEM ve SHV-tiplerinin ikisini birden, 4'ünün (% 20) sadece SHV-tipini taşıdığı, 2'sinin (% 10) her iki geni de taşımadığı; *Klebsiella* spp.'nin 6'sının (% 30) TEM ve SHV-tiplerinin ikisini, 2'sinin (% 10) sadece SHV-türevlerini taşıdığı, 1'inin (% 5) ise her iki geni de taşımadığı ve *Enterobacter* spp.'nin 2'sinin (% 10) her iki geni de taşıdığı transkonjugantlarına uygulanan TEM ve SHV-spesifik PCR ile belirlendi. Sadece TEM-türevi GSBL geni kodlayan konjugatif plazmide sahip suşa rastlanmadı (Tablo. 14).

Tablo 14. GSBL Üreten Suşlarda TEM ve SHV Türevi Genlerin Dağılımı

	TEM		SHV		TEM+SHV		Diğer	
GSBL Üreten İzolatlar	**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**	**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**	**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**	**Sayı (n)**	**Yüzde (%)**
E. coli *(n=9)*	-	-	4	20	3	15	2	10
Klebsiella spp. (n=9)	-	-	2	10	6	30	1	5
Enterobacter *spp. (n=2)*	-	-	-	-	2	10	-	-
TOPLAM (n=20)	**0**	**0**	**6**	**30**	**11**	**55**	**3**	**15**

4.7. Plazmidlerin *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ Probları ile Hibridizasyonu

bla$_{TEM}$ probu A grubunun plazmidlerin (pTRE25 ve pTRE37) fragmanlarından 6.6 kb ve 3.5 kb'lik *Eco*RI fragmanları ile hibridize olduğu saptandı. Aynı prob, B-1 grubunda (pTRE63 ve pTRE164) 23 kb, 12.5 kb, 9.4 kb fragmanlara hibridize olurken, B-2 grubunda (pTRE88 ve pTRE90) bu fragmanlara ek olarak 3.6 kb ve 3.2 kb'lik fragmanlar ile, ve C grubunda 20, 18, 13 ve 4.1 kb'lik fragmanlar ile hibridize oldu (Şekil 14). D (pTRE83 ve pTRE92), E (pTRE40 ve pTRE73), I (pTRE160), J (pTRE66), K (pTRE157) (Şekil 14) ve L (pTRE56) (Şekil 14) gruplarında ise *bla*$_{TEM}$ probunun hibridize olduğu fragman gözlenmedi. F grubunda

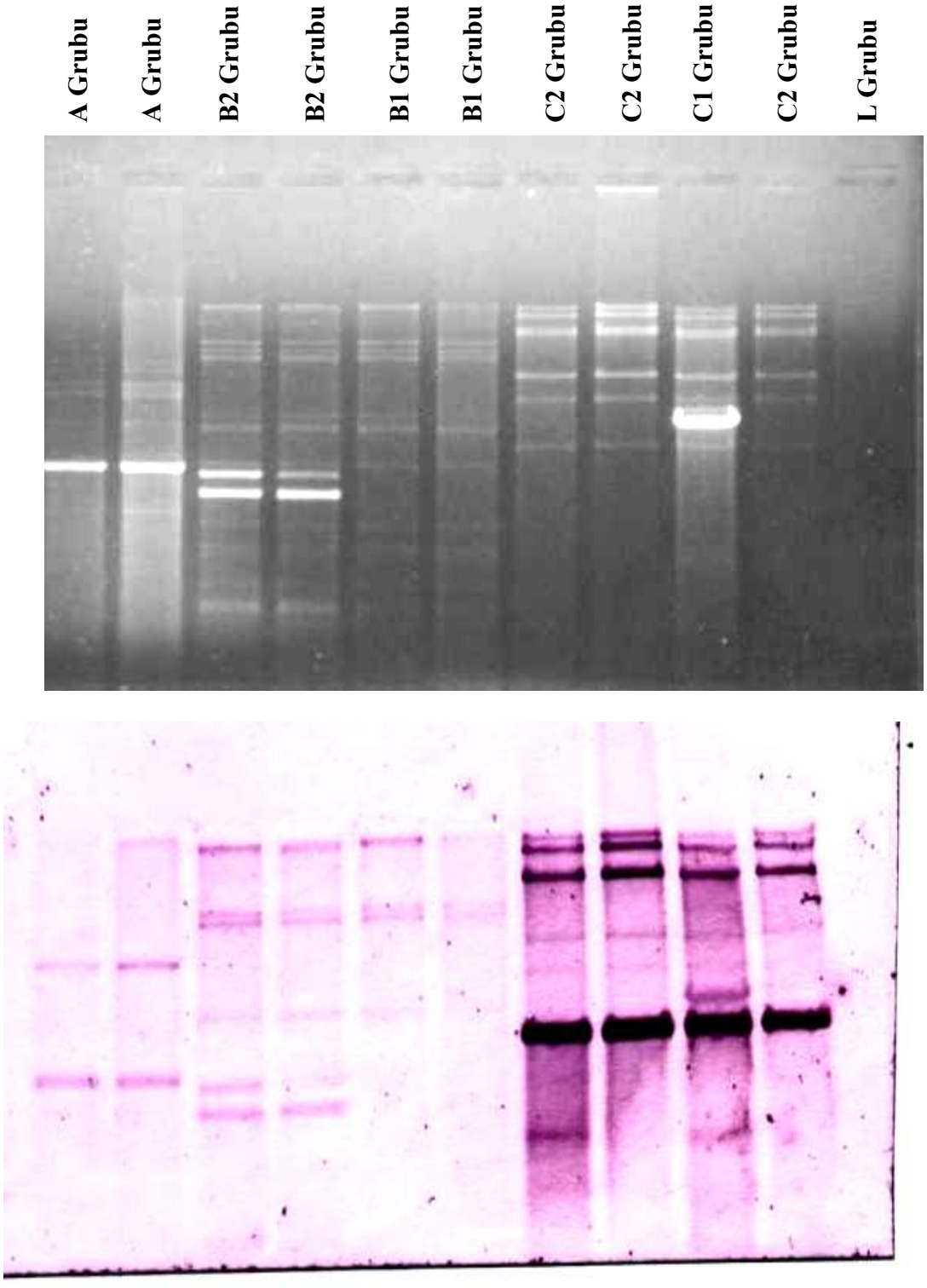
(pTRE154) 5.9 ve 5.2 kb'lik fragmanlara hibridize olurken, G grubunda (pTRE82) 16 kb'lik fragmana (Şekil 15) hibridize oldu (Tablo 15).

bla$_{SHV}$ probu A grubu plazmidlerin 23 kb'lik, B grubunun 21.5 kb'lik, C grubunun ise 18.5, 13,5 ve 4.8 kb'lik *Eco*RI fragmanları ile hibridize oldu (Şekil 16). Bununla birlikte, D (Şekil 17) ve L (Şekil 16) grubu plazmidlerin hiçbir fragmana SHV probu hibridize olmadı. E grubu plazmidlerde 5.5 kb'lik, F grubunda 10 ve 3.7 kb'lik fragmanlar ile hibridize oldu. G grubu plazmidin 4.9 kb'lik, H grubunun 23 kb'lik, I grubunun 18 ve 6.3 kb'lik, J grubunun 18, 13.5, ve 2.5 kb'lik fragmanları, K grubunun ise 25 ve 1.1 kb'lik fragmanlar ile hibridize olduğu (Şekil 17) gözlendi (Tablo 15).

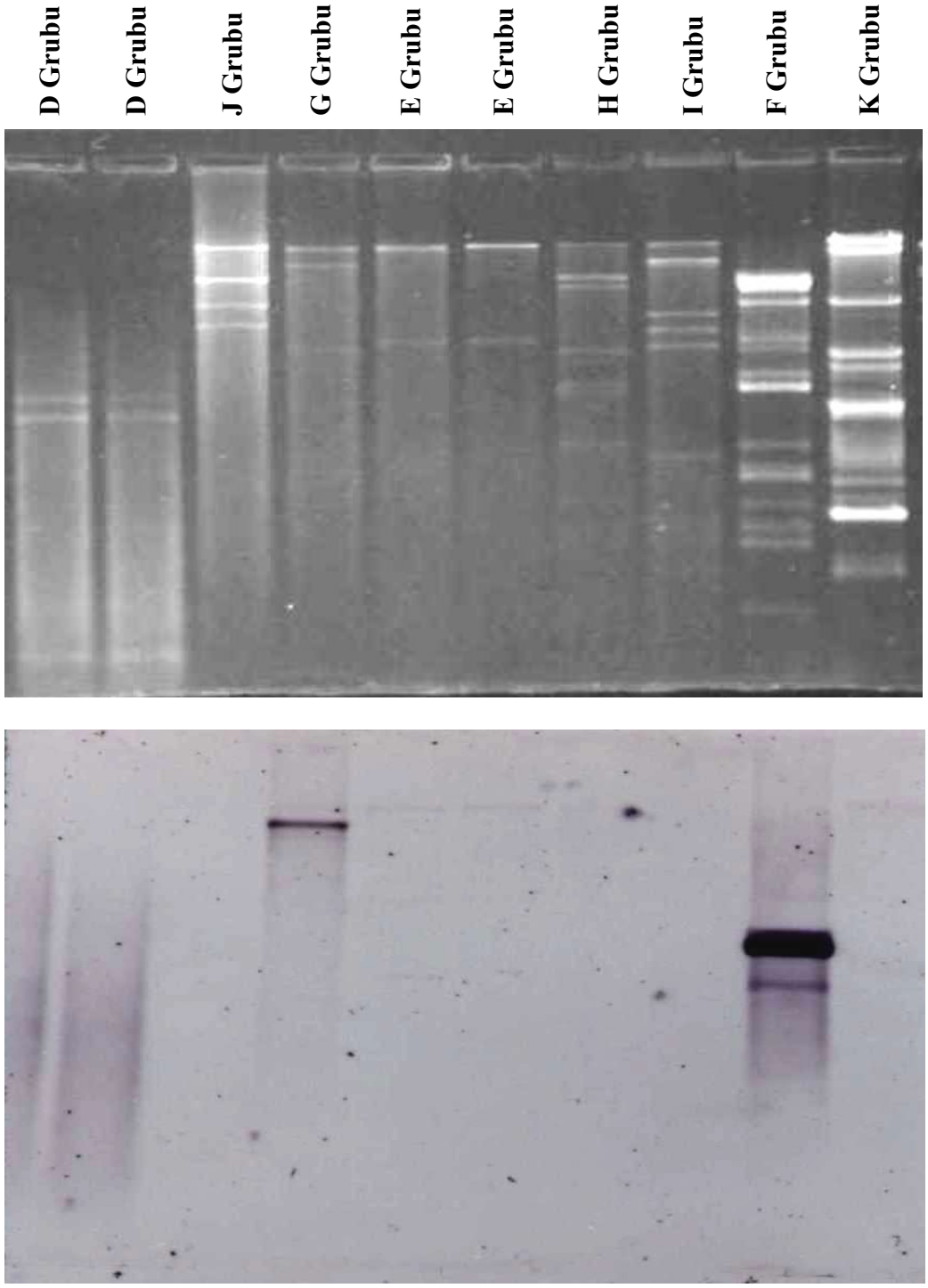
Tablo 15. *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ Problarının Hibridize Olduğu Plazmidlerin *Eco*RI Restriksiyon Fragmanları

Plazmid Grupları	Hibridize Olduğu Restriksiyon Fragmanı	
	***bla*$_{TEM}$ Probu**	***bla*$_{SHV}$ Probu**
A	6.6 kb, 3.5 kb	23 kb
B-1	23 kb, 12.5 kb, 9.4 kb	21.5 kb
B-2	23 kb, 12.5 kb, 9.4 kb, 3.6 kb, 3.2 kb	21.5 kb
C-1	20 kb, 18 kb, 13 kb, 5.3, 4.1 kb	18.5 kb, 13.5 kb, 4.8 kb
C-2	20 kb, 18 kb, 13 kb, 4.1 kb	18.5 kb, 13.5 kb, 4.8 kb
D	-	-
E	-	5.5 kb
F	5.9 kb, 5.2 kb	10 kb, 3.7 kb
G	16 kb	4.9 kb
H	-	23 kb
I	-	18 kb, 6.3 kb
J	-	18 kb, 13.5 kb, 7.5 kb
K	-	25 kb, 1.1 kb
L	-	-

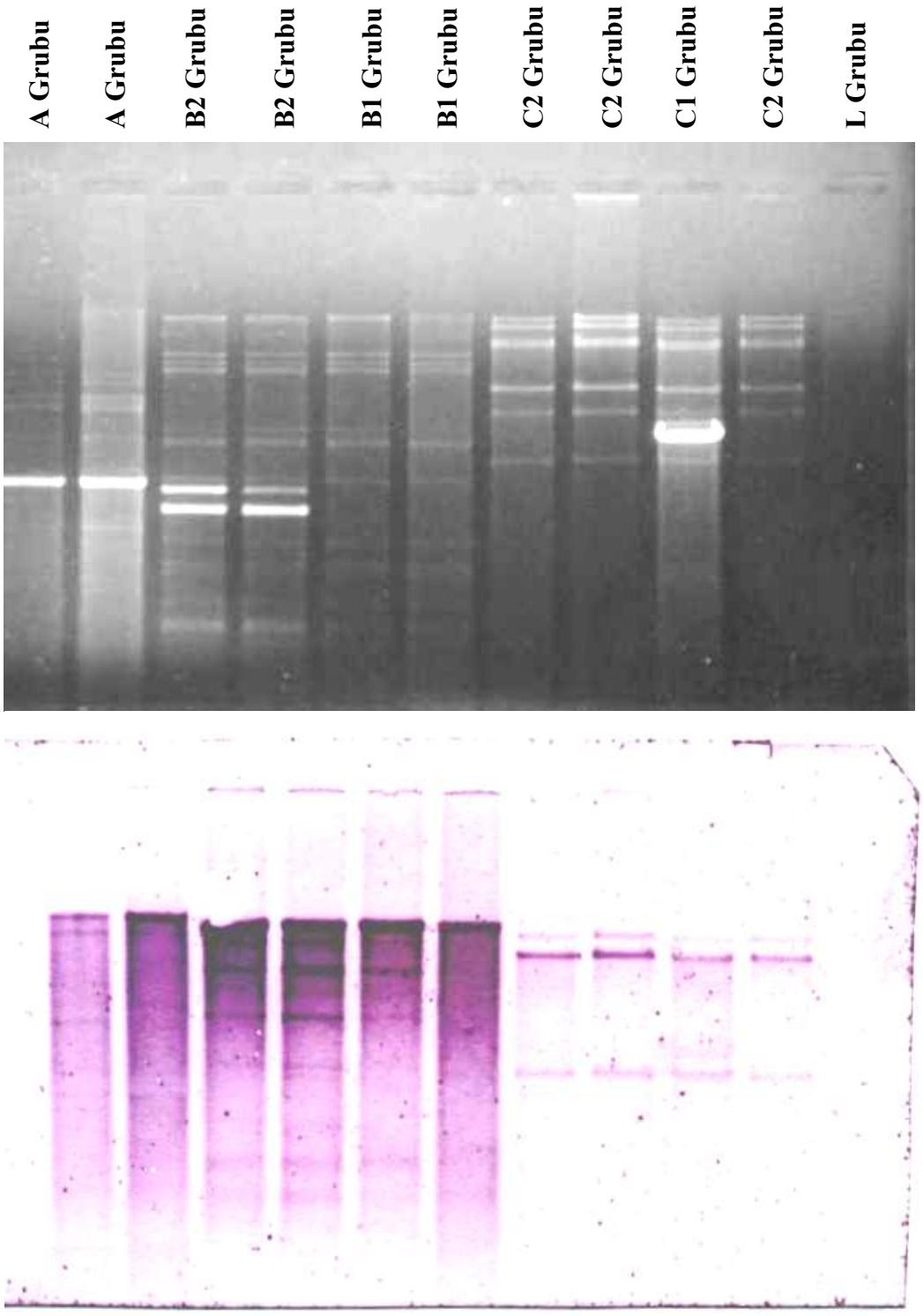
Plazmid gruplarının *Eco*RI restriksiyon fragmanlarına bla_{TEM} ve bla_{SHV} problarının hibridize olduğu restriksiyon fragmanları Şekil 14, 15, 16 ve 17'de gösterildi.



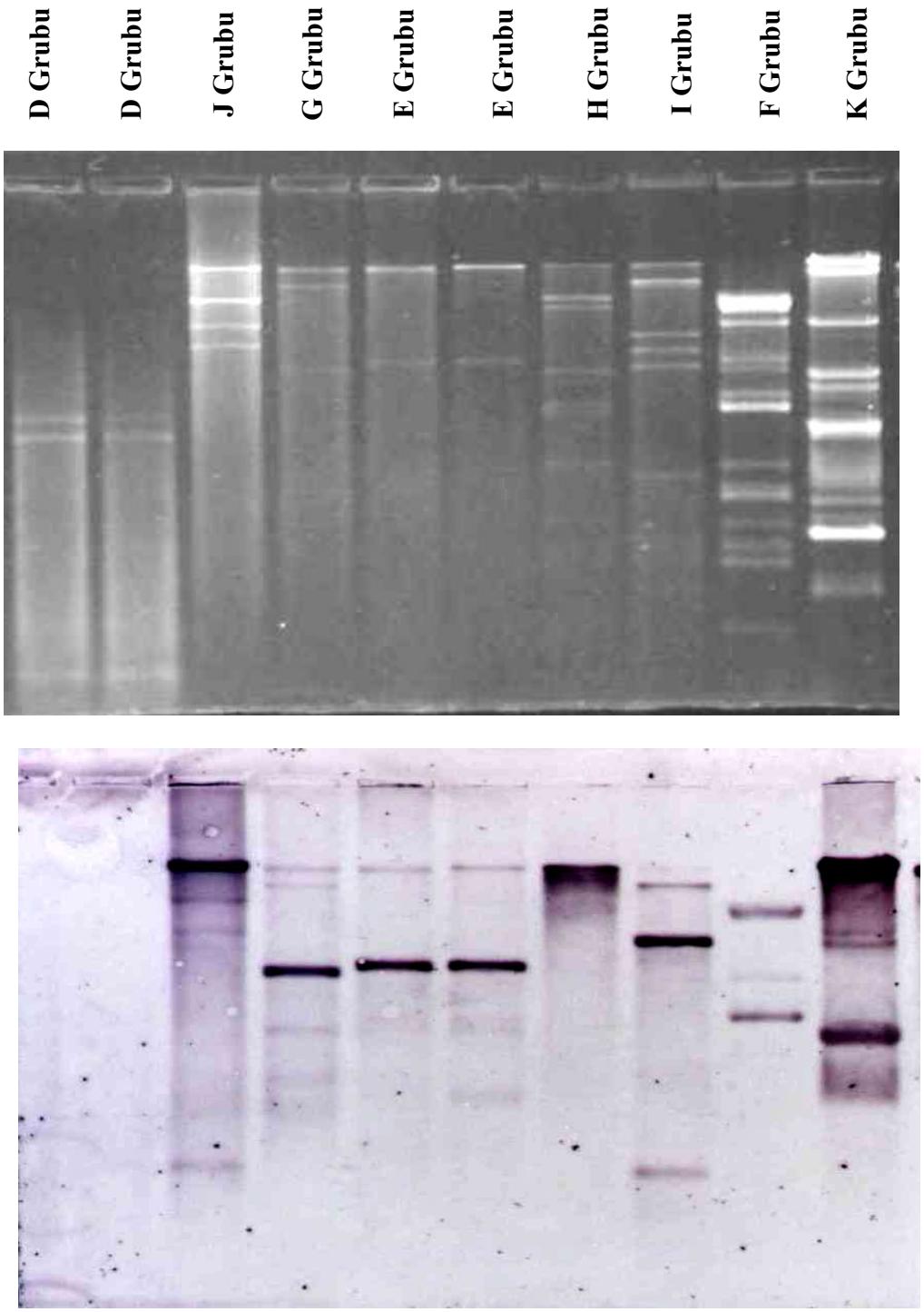
Şekil 14. *bla*$_{TEM}$ Probunun A, B1, B2, C1, C2 ve L Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu



Şekil 15. *bla*$_{TEM}$ Probunun D, J, G, E, H, I , F ve K Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu



Şekil 16. *bla*$_{SHV}$ Probunun A, B1, B2, C1, C2 ve L Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu



Şekil 17. *bla*$_{SHV}$ Probunun D, J, G, E, H, I, F ve K Grubu Plazmidler ile Hibridizasyonu

4.8. Enterobakterilerin ve Transkonjugantlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Test Sonuçları

GSBL üreten suşlar arasında TRE082 suşu hariç amikasin dirençli suş tespit edilmedi. Bu suşun transkonjugantında da amikasin direnci saptanmadı. Transkonjugantların hiçbirinde kloramfenikol direncine rastlanmadı.

A grubu plazmid içeren TRE025 ve TRE037 suşları amoksisilin/klavulanata hassasken, I., II., III., IV. kuşak sefalosporinlere ve aztreonama dirençli bulundu. Transkonjugantları da aynı direnç profilini gösterdi. Suşlarda β-laktam direnci yanında netilmisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci belirlendi. Bu dirençlerin plazmidleri tarafından kodlanmadığı saptandı (Tablo 16).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
K. pneumoniae TRE025	16	R	R	R	R	R	R	R	18	R	14	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE25)**	**16**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**25**	**26**	**22**	**21**	**26**	**26**	+	TEM, SHV
K. pneumoniae TRE037	14	R	R	R	R	R	R	R	20	R	16	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE37)**	**16**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**26**	**26**	**22**	**20**	**27**	**28**	+	TEM, SHV

R, dirençli.

Tablo 16. A Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

B2 grubu plazmid taşıyan TRE088 ve TRE090 amoksisilin/klavulanat direnci gösterirken, B1 grubundaki TRE063 ve TRE164'te bu antibiyotiğe direnç rastlanmadı. B2 grubundan TRE088 suşu I., II., III., IV. kuşak sefalosporinlere ve aztreonama dirençliyken, aynı gruptaki TRE090 sefepime hassastı. TRE088 suşu aminoglikozidlere, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfometaksazole hassasken, TRE090 suşu gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazola dirençli bulundu. B1 grubundan TRE063 ve TRE164 suşlarının her ikisi de amoksisilin/klavulanata hassastı. Bunlardan TRE063 suşunun β-laktamlardan sefalosporinlerin bütün gruplarına, TRE164'ün ise sefotaksim ve sefepim haricinde diğer β-laktamlara dirençli olduğu saptandı. TRE063 suşu gentamisin ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci gösterirken, TRE164'te sadece gentamisin direncine rastlandı. J53-2 (pTRE88) suşu amoksisilin/klavulanat yanında sefotaksim, seftriakson ve sefepim haricinde diğer sefalosporinlere ve aztreonama dirençliyken, J53-2 (pTRE90) sefepim haricinde diğer sefalosporinlere ve aztreonama dirençli bulundu. Bu suşlarda ayrıca gentamisine direnç tespit edildi. J53-2 (pTRE63) ve J53-2 (pTRE164) sefotaksim ve sefepim haricinde diğer sefalosporin gruplarına, aztreonama ve gentamisine dirençliydi (Tablo 17).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
E. aerogenes TRE088	R	R	R	R	R	R	R	R	20	21	R	18	24	25	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE88)**	**20**	**R**	**R**	**R**	**17**	**15**	**16**	**R**	**27**	**18**	**R**	**20**	**26**	**25**	+	TEM, SHV
E. coli TRE090	R	R	R	R	R	R	16	R	20	16	R	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE90)**	**21**	**R**	**R**	**R**	**19**	**15**	**17**	**R**	**29**	**18**	**R**	**20**	**27**	**27**	+	TEM, SHV
K. oxytoca TRE063	15	R	R	R	R	R	R	R	18	18	R	15	24	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE63)**	**17**	**R**	**R**	**R**	**15**	**R**	**17**	**R**	**20**	**19**	**R**	**16**	**26**	**25**	+	TEM, SHV
E. aerogenes TRE164	15	R	R	R	15	R	16	R	20	14	R	16	26	17	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE164)**	**17**	**R**	**R**	**R**	**15**	**R**	**17**	**R**	**20**	**19**	**R**	**16**	**26**	**25**	+	TEM, SHV

R, dirençli.

Tablo 17. B Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

C2 grubu plazmid içeren klinik suşlarının hepsi amoksisilin/klavulanata, bütün sefalosporin gruplarına ve aztreonama dirençli bulundu. Diğer antibiyotiklerden netilmisin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci bütün C1 ve C2 grubu plazmid içeren klinik suşlarda rastlandı. C1 ve C2 grubu plazmid taşıyan transkonjugantların hepsi amoksisilin/klavulanata dirençli bulunurken, bütün sefalosporinlere ve aztreonama direnç tespit edildi. Bunun yanında gentamisin ve tetrasikline de direnç gözlendi (Tablo 18).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
K. pneumoniae TRE044	R	R	R	R	R	R	R	R	21	13	R	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE44)**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**21**	**18**	**R**	**R**	**28**	**26**	+	TEM, SHV
E. coli TRE153	R	R	R	R	R	R	R	R	16	R	R	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE153)**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**19**	**18**	**R**	**R**	**28**	**26**	+	TEM, SHV
K. pneumoniae TRE165	R	R	R	R	R	R	R	R	18	R	R	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE165)**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**22**	**14**	**R**	**R**	**24**	**28**	+	TEM, SHV

R, dirençli.

Tablo 18. C Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

D grubu plazmid içeren TRE083 suşunda amoksisilin/klavulanata hassasiyet,. β-laktam antibiyotiklerden sefazolin, sefuroksim, seftazidim ve aztreonama direnç tespit edildi. Bu suşta gentamisin direncine de rastlandı. Aynı gruptaki TRE092'deki β-laktam direnç profili TRE083 suşu ile aynıydı ve gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazole direnç gözlendi. Bu suşların transkonjugantlarında orijinal suştaki β-laktam dirençleri tespit edildi. Bununla birlikte, transkonjugantlarında gentamisin direnci tespit edildi (Tablo 19).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
K. pneumoniae TRE083	18	R	R	R	16	R	R	R	20	15	R	18	26	20	+	?
***E. coli* J53-2 (pTRE83)**	**18**	**R**	**R**	**R**	**17**	**16**	**16**	**R**	**22**	**19**	**R**	**21**	**27**	**27**	+	?
E. coli TRE092	17	R	R	R	17	16	17	R	22	19	R	R	R	R	+	?
***E. coli* J53-2 (pTRE92)**	**18**	**R**	**R**	**R**	**27**	**24**	**25**	**R**	**22**	**19**	**R**	**21**	**25**	**27**	+	?

R, dirençli

Tablo 19. D Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

E grubu plazmid içeren TRE040 ve TRE073 suşları amoksisilin/klavulanat direncine sahipti. TRE040 suşunda seftazidim haricinde bütün sefalosporinlere direnç tespit edildi. Bunun yanında, trimetoprim/sülfometaksazola da direnç saptandı. TRE073 suşunda sefazolin, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, sefepim, aztreonam, netilmisin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazole direnç tespit edilirken, transkonjugantlarında sefazolin, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, sefepim ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci saptandı (Tablo 20).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
K. pneumoniae TRE040	R	R	R	20	R	R	R	17	22	19	18	20	26	R	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE40)**	**R**	**R**	**R**	**22**	**R**	**R**	**R**	**18**	**26**	**24**	**24**	**22**	**30**	**R**	+	SHV
E. coli TRE073	R	R	R	R	R	R	R	R	22	13	R	R	R	R	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE73)**	**R**	**R**	**R**	**19**	**R**	**R**	**R**	**16**	**26**	**25**	**20**	**20**	**21**	**R**	+	SHV

R, dirençli

Tablo 20. E Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

F grubu plazmid taşıyan TRE154'te amoksisilin/klavulanat, sefalosporinler, aztreonam ve tetrasiklin direnci tespit edilirken, transkonjugantında bütün sefalosporinlere ve aztreonama karşı direnç tespit edildi. (Tablo 21).

G grubu plazmid taşıyan TRE082'de amoksisilin/klavulanata, bütün sefalosporin grupları ve aztreonama, amikasin, netilmisin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazola direnç saptandı. Transkonjugantı amoksisilin/klavulanata, bütün sefalosporin gruplarına, aztreonama, gentamisin ve trimetoprim/sülfometaksazola dirençli bulundu (Tablo 21).

H grubu plazmid taşıyan TRE146 suşu amoksisilin/klavulanat, sefazolin, sefuroksim, seftazidim, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfometaksazola dirençliyken, transkonjugantında amoksisilin/klavulanat, sefazolin, sefuroksim ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci tespit edildi (Tablo 21).

I grubu plazmid taşıyan TRE160 suşunda amoksisilin/klavulanat, sefazolin ve sefuroksim direnci saptanırken, transkonjugantında ise aynı direnç profili tespit edildi (Tablo 21).

J grubu plazmid taşıyan TRE066 suşu sefazolin, sefuroksim, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazole dirençliyken, transkonjugantı bütün antibiyotiklere hassas olarak bulundu (Tablo 21).

K grubu plazmid taşıyan TRE157 amoksisilin/klavulanat, sefazolin ve sefuroksime dirençliyken, transkonjugantında aynı direnç profili tespit edildi (Tablo 21).

L grubu plazmid içeren TRE056 suşunda seftazidim hariç bütün sefalosporinlere direnç saptandı. Ayrıca, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci de tespit edildi. Transkonjugantında da bütün sefalosporinlere ve trimetoprim/sülfometaksazola direnç tespit edildi (Tablo 21).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**	**GSBL**	***bla***
E. coli TRE154	R	R	R	R	R	R	R	R	19	20	20	R	20	18	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE154)**	**18**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**16**	**R**	**24**	**24**	**20**	**20**	**26**	**30**	+	TEM, SHV
K. oxytoca TRE082	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+	TEM, SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE82)**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**26**	**26**	**R**	**18**	**27**	**R**	+	TEM, SHV
K. pneumoniae TRE146	R	R	R	R	32	24	21	25	20	20	17	R	25	R	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE146)**	**R**	**R**	**R**	**21**	**32**	**27**	**21**	**26**	**25**	**24**	**20**	**17**	**25**	**R**	+	SHV
E. coli TRE160	R	R	R	25	27	26	22	26	20	20	17	16	22	22	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE160)**	**R**	**R**	**R**	**26**	**32**	**30**	**26**	**30**	**21**	**22**	**19**	**17**	**25**	**26**	+	SHV
E. coli TRE066	16	R	R	26	30	22	25	28	21	22	20	R	R	R	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE66)**	**18**	**17**	**16**	**27**	**33**	**28**	**29**	**24**	**28**	**28**	**22**	**18**	**25**	**26**	+	SHV
E. coli TRE157	R	R	R	23	26	25	24	26	22	22	17	17	24	25	+	SHV
***E. coli* J53-2 (pTRE157)**	**R**	**R**	**R**	**24**	**27**	**28**	**26**	**28**	**24**	**24**	**18**	**19**	**26**	**26**	+	SHV
E. coli TRE056	18	R	R	21	R	R	R	16	20	20	18	R	R	R	+	?
***E. coli* J53-2 (pTRE56)**	**18**	**R**	**R**	**21**	**R**	**R**	**R**	**16**	**26**	**25**	**21**	**20**	**25**	**14**	+	?

R, dirençli

Tablo 21. F, G, H, I, J, K, L ve M Grubu Konjugatif Plazmid Taşıyan Suşların Antimikrobiyal Hassasiyet Testleri

GSBL üreten enterobakteri izolatlarının 15/21'inde (% 71.42) amoksisilin/klavulanat, bütün türlerde sefazolin ve sefuroksim, 17/21'inde (% 80.95) seftazidim, 16/21'inde (% 76.19) sefotaksim, 17/21'inde (% 80.95) seftriakson, 15/21'inde (% 71.42) sefepim, 16/21'inde (% 76.19) aztreonam, 1/21'inde (% 4.76) amikasin, 6/21'inde (% 28.57) netilmisin, 12/21'inde (% 57.14) gentamisin, 16/21'inde (% 76.19) tetrasiklin, 13/21'inde (% 61.90) kloramfenikol, 16/21'inde (% 76.19) trimetoprim/sülfometaksazol dirençleri tespit edildi (Tablo 22).

SUŞLAR	**Amc**	**Cz**	**Cxm**	**Caz**	**Ctx**	**Cro**	**Fep**	**Atm**	**Ak**	**Net**	**Cn**	**Te**	**C**	**Sxt**
E. coli (n=9)	6/9	9/9	9/9	5/9	5/9	5/9	5/9	4/9	0/9	1/9	3/9	7/9	5/9	5/9
Klebsiella spp. (n=9)	7/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	1/9	5/9	6/9	8/9	6/9	9/9
Enterobacter (n=2)	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	1/2	1/2
TOPLAM (n=20)	**15/20**	**20/20**	**20/20**	**17/20**	**16/20**	**17/20**	**15/20**	**16/20**	**1/20**	**6/20**	**12/20**	**16/20**	**13/20**	**16/20**

Tablo 22. GSBL Üreten Enterobakterilerin Antibiyotiklere Direnç Oranı.

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonların etiolojik ajanlarından çoğunu içine alan bir ailedir. Üriner sistem, intra-abdominal enfeksiyonlar, üst ve alt solunum sistemi, deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve bakteriyemi yapabilen türler içermektedir. Toplum kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen enterobakteriler *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabili*s olup, hastane enfeksiyonlarına *Enterobacte*r spp, *Serratia* spp. ve *Citrobacter* spp.'ler de dahil olmaktadır (43). Bu çalışmada % 53.40 *E. coli*, % 23.86 *Klebsiella* spp., % 11.93 *Proteus* spp., % 9.65 *Enterobacter* spp. ve % 1.13 oranlarında *Serratia* spp. izole edildi.

E. coli, *Klebsiella* ve *Serratia* türlerinde genellikle AmpC tip kromozomal β-laktamazlar üretilir. *E. coli*'nin konstitütif olarak ürettiği enzim düşük miktarda olduğundan dolayı genellikle bu suşlar ampisiline hassastır. *Enterobacter* ve *Serratia* türlerinde de AmpC tip enzim üretilmesine rağmen, *E. coli*'den farkı indüklenebilir olmasıdır. Düşük miktarda üretilen enzim, bakteri β-laktam antibiyotiklerle karşılaştığında bol miktarda üretilir. Bu yüzden ampisiline her zaman dirençlidirler. *Klebsiella* türleri ise A sınıfı kromozomal β-laktamaz üretirler. Bu yüzden ampisiline doğal olarak dirençlidirler. *P. vulgaris* türlerinde *Klebsiella*'lardaki gibi A sınıfı kromozomal β-laktamaz üretilir, fakat *P. mirabilis*'in ürettiği kromozomal β-laktamaz enterik bakteriler içinde en etkisiz olanıdır. Bu yüzden bir çok suş ampisiline hassastır (21). Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 176 enterik bakterinin 133'ünde (% 75.56) NCCLS (17) kriterlerine göre ampisilin direncine (≥ 32µg/ml) rastlandı (Tablo 8).

Klebsiella spp., *Enterobacter* spp. ve *Serratia* spp.'lerde ampisiline direnç % 100 oranında tespit edildi. *E. coli* ve *Proteus* türlerinde ise sırasıyla % 64.89 ve % 52.38 oranındaydı. Zsuzsanna ve ark (44) enterobakteri izolatlarında % 48-69 oranında ampisilin direncine rastlamışlardır.

Ampisilin dirençli enterobakterilerde direncin ekstrakromozomal olanlarını belirlemek için konjugasyon deneyleri yapıldı. Bunun için hassas bir *E. coli* K-12 laboratuar suşu olan J53-2 kullanıldı. Suş F^- olup metionin ve prolin amino asitlerini kendisi sentez edememektedir. Kromozomal olarak rifampisine dirençlidir.

Rice ve ark. (40)'nın filtre kağıdı üzerinde yaptıkları konjugasyon deneylerinde J53-2 transkonjugantlarının seçilmesinde 10 µg/ml seftazidim, 100 µg/ml rifampisin, 30 µg/ml metionin ve 50µg/ml prolin içeren % 0.2'lik glukoz minimal medyum kullanmışlardır. Bu çalışmada konjugasyon deneyleri sıvıda yapıldı ve transkonjugantlar 50 µg/ml ampisilin ve 150 µg/ml rifampisin içeren EMB agar plağında seçildi. Verici bakterilerin bazıları rifampisine dirençli olduğundan dolayı, üreyebilen bakterilerin gerçek transkonjugant olduklarının ve spontane üremelerin ayırt edilebilmesi için tekrar ampisilin/rifampisin plağına pasaj edildikten sonra, fenotipik olarak J53-2 olduğu belirlenen kolonilerin 4 farklı plağa replika ekimleri yapıldı. Replika ekim yapılan plaklardan glukoz minimal medyum haricinde diğer üç plakta üreyebilen bakterilerin transkonjugant olduklarına daha güvenilir olarak karar verildi.

Konjugasyon işlemi oda sıcaklığı ve 35ºC'de yapıldı. Konjugasyon etkinliğinde oda sıcaklığı ve 35ºC arasında fark bulunamadı (Tablo 9). Klinik suşlar 10^{-4} ile 10^{-8} arasındaki etkinlikle ampisilin dirençlerini hassas *E. coli* suşuna transfer ettiler. Konjugasyon etkinliği en fazla olan suşlar $!0^{-4}$ etkinlikle *E. coli* TRE160 ve *K. pneumoniae* spp. *ozaenae* TRE173'tü (Tablo 8).

Konjugasyonla gen transferi yapabilen mikroorganizmaların canlı vücudunda, özellikle normal mikrobiyal flora bakterileri arasında çok daha yüksek etkinlikle gen transferi yapabildiği in vivo deneylerde gösterilmiştir (15). Bu çalışmada in vitro ortamda düşük etkinlikle konjugasyon yapabilen bazı enterobakteri türlerinin

bu hipoteze göre direnç genlerinin konak içinde daha yüksek etkinlikle transfer edilebileceğini, dolayısıyla daha hızlı yayılarak paylaşılabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber suşların oda sıcaklığında konjugasyonla gen transferi yapabilmeleri, konak dışı çevrelerde de direnç genlerini transfer edebileceklerini göstermektedir.

Transkonjugantlardan izole edilen 20 plazmidin moleküler büyüklükleri *Eco*RI restriksiyon enzim analizine göre 6.7 ile 93.1 kb arasında bulundu (Tablo 9). Jacoby (2) 1991'de rapor ettiği GSBL'lerle ilgili derlemesinde GSBL kodlayan konjugatif direnç plazmidlerinin genelde büyük moleküler ağırlıkta (80 kb veya daha fazla) olduklarını belirtmiştir.

Bermudes ve ark. (45) 1997'de Fransa'daki bir hastanede PI, PII-1, PII-2, PII-3 ve PII-4 olmak üzere 5 plazmid profili belirlemişlerdir. Palucha ve ark. (9) ise 1999'da rapor ettikleri çalışmada Varşova Hastanesi'nde izole edilen plazmidlerin *Pst*I restriksiyon enzim analizlerinde A ile I arasında 8 grup epidemik konjugatif plazmide rastlamışlardır. Bu çalışmada 20 plazmidin *Eco*RI restriksiyon analizi ile belirlenen plazmidler arasındaki benzerliklere göre A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K ve L olmak üzere 12 tip olarak gruplandırıldı. A grubundan 2, B grubundan 4, C grubundan 3, D grubundan 2, E grubundan 2 kendi gruplarında aynı restriksiyon enzim kesim paterni gösterdiğinden dolayı epidemik plazmidler olarak, tek plazmid örneği içeren diğer gruplar kendine özgü patern gösterdiklerinden dolayı nonepidemik plazmidler olarak değerlendirildi. Bunun yanında, epidemik olanları doğrulamak için, *Eco*RI restriksiyon fragmanlarının bla_{TEM} ve bla_{SHV} problarıyla yapılan hibridizasyonlarında problar aynı gruplarda aynı fragmana hibridize oldular (Şekil 14-17 ve Tablo 15). Ayrıca epidemik plazmidleri taşıyan J53-2 transkonjugantlarının antibiyogram sonuçlarına göre aynı grup plazmidleri taşıyan transkonjugantlar benzer antibiyotik direnç profili gösterdiler (Tablo 15). Epidemik plazmidlerden B-1 grubu (pTRE63 ve pTRE164) B-2 grubu (pTRE88 ve pTRE90) ile aynı EcoRI kesim paterni gösterdi fakat, B-2 grubunun farklı olarak 3 kb'lik ek bir fragmanı olduğu için B grubu kendi içinde B-1 ve B-2 olarak gruplandırıldı. Aynı şekilde C grubu plazmidlerde C-1 grubu (pTRE165) C-2 grubu plazmidlerden

(pTRE44 ve pTRE153) 5.3 kb fazla fragman taşıdığı için C-1 ve C-2 olarak gruplandırıldı (Tablo 9 ve Şekil 11). Bu çalışmada rastlanan 5 grup epidemik plazmid hem hastane içi hem de hastane dışı hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edildi. Epidemik plazmidlerden A, B-1, C (C-1 ve C-2) ve E grubu plazmidler hastane içindeki suşlardan izole edilirken, B-2 grubu plazmidler hastane dışı hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edildiler. Sadece D grubu epidemik plazmidler hastane dışı hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edildiler. D grubu PCR ve hibridizasyonda TEM veya SHV spesifik primer veya problarıyla reaksiyona girmedi (Tablo 10 ve 13). B grubu plazmidlerin hem hastane içi hem de hastane dışı hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edilmesi bu plazmidlerin toplum ve hastane suşları arasında yayıldığını ve paylaşıldığını düşündürmektedir. D grubu hariç bütün epidemik plazmidlerin TEM ve SHV-türevi GSBL'lerin her ikisini de kodlaması ve birçoğunun β-laktam antibiyotiklerin yanında aminoglikozid, sulfonamid ve tetrasiklin gibi başka direnç genlerini kodlaması (Tablo 16) direnç genlerinin toplum ve hastane içinde kolaylıkla yayıldığını ispat etmektedir.

C-2 grubu plazmid taşıyan *E. coli* TRE153 suşu pediatri yoğun bakımdaki bir hastanın trakeal aspirat sıvısından izole edildi. Beş gün sonra aynı hastanın trakeal aspiratından C-1 grubu plazmid taşıyan *K. pneumoniae* TRE165 suşu izole edildi. TRE165 suşu TRE153'ten farklı olarak 5.3 kb'lik başka bir plazmid içermekteydi (Şekil 9). *Eco*RI ile kesilmiş C-1 plazmidinin 5.3 kb'lik fragmanına bla_{TEM} probu güçlü bir şekilde hibridize oldu fakat bla_{SHV} probu hibridize olmadı (Şekil 14 ve 16). C-1 grubundan pTRE165 ile C-2 grubundan pTRE153 aynı hastanın farklı enfeksiyon etkenlerinden izole edildi fakat C-2 grubundaki pTRE44 farklı bir hastanın enfeksiyon etkeninden izole edildi. Bu yüzden C grubu plazmidler epidemik olarak değerlendirildi (Tablo 5 ve 10).

Prodinger ve ark. (46)'na göre epidemiolojik olarak benzer izolatların plazmid profillerinin her zaman aynı olması gerekmemektedir. Çünkü suş bir plazmid kazanıp bunu tekrar kaybedebilmektedir. Bu durum rasgele veya spesifik antibiyotik terapisinden kaynaklanan farklı selektif baskılardan dolayı oluşmaktadır

ve plazmid epidemisine yol açmaktadır. Bu çalışmada 20 (% 15.03) konjugatif direnç plazmidi taşıyan türler hastane ünitelerinden sadece pediatri yoğun bakım, pediatrik cerrahi servisi, pediatri adelösan servisi, pediatri süt çocuğu servisi, enfeksiyon servisi, dahiliye servisi-I, pediatri polikliniği ve pediatrik cerrahi polikliniğindeki hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edildiler. Konjugatif direnç plazmidleri taşıyan suşlara hastanede kalan hastalardan en fazla % 23.80 oranla pediatrik cerrahi servisinde ve % 19.04 oranla pediatri yoğun bakımda kalan hastaların enfeksiyon etkenlerinde rastlandı. Poliklinik hastalarında ise % 28. 57 oranla pediatri polikliniğine başvuran hastaların enfeksiyon etkenlerinde rastlandı. (Tablo 11).

B1 grubu plazmidlerden pTRE164 enfeksiyon servisindeki bir hastanın trakeal aspiratından izole edilen bir *K. pneumoniae* suşundan, aynı gruptaki pTRE63 ise pediatrik cerrahi servisindeki bir hastanın idrar materyalinden izole edilen bir *K. oxytoca* suşundan izole edildi. Aynı şekilde C-1 grubu pTRE165 plazmidi pediatri yoğun bakımdaki bir hastanın trakeal aspiratından izole edilen *K. pneumoniae* suşu (TRE165), C-2 grubundan pTRE44 pediatri süt çocuğu servisindeki bir hastanın idrarından izole edilen *K. pneumoniae* suşu (TRE044), aynı gruptaki pTRE153 ise pediatri yoğun bakımdaki bir hastanın trakeal aspiratından izole edilmiş bir *E. coli* suşu (TRE153) tarafından taşınıyordu (Tablo 10). Bu durum aynı plazmidin servisler arasında aynı veya farklı türlere yayıldığını göstermektedir. Bermudes ve ark. (45) PI olarak grupladıkları plazmidlere hastanenin farklı ünitelerinde rastlarken PII grubunun devamlı nöroşirurji ünitesinden geldiğini rapor etmişlerdir. Palucha ve ark. (9) epidemik plazmidlerin büyük bölümünün üroloji ünitesinden orijin alarak cerrahi ve dahiliye ünitelerine yayıldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada epidemik plazmidleri taşıyan enterik patojenler genelde pediatri ile ilgili yoğun bakım ve servislerindeki hastalardan izole edildiler. Yirmi konjugatif plazmidin 13'ünün hastane içi ünitelerde bulunan hastalarda, 7'sinin ise poliklinik hastalarında taşınmasıyla, konjugatif direnç plazmidlerine hastane içi izolatlarında daha fazla rastlandığı kanısına varıldı (Tablo 11).

Plazmidle kodlanan A sınıfı enzimler olan TEM veya SHV-tipi genlerde bir veya birden fazla amino asit değişikliğine sebep olan tek adımlı (stepwise) mutasyonlarla GSBL'ler oluşmaktadır. Böylece sefotaksim, seftazidim ve diğer geniş-spektrumlu sefalosporinler ile aztreonam gibi monobaktamlara bu enzimler vasıtasıyla bakteriler direnç kazanmaktadır (2). Bu çalışmadaki epidemik plazmidleri taşıyan suşların fenotipik olarak β-laktam antibiyotiklere yüksek oranda direnç gösterdiği bulundu (Tablo 16-21). GSBL enzimleri kodladıklarından dolayı NCCLS (17) kriterlerine göre bu plazmidleri taşıyan enterobakterilerin β-laktam antibiyotiklerden karbapenemler hariç hepsine dirençli rapor edilmesi gerektiği sonucuna varıldı. Bu enzimler ilk olarak Doğu Avrupa'da rapor edildiler ve dünyanın her yerinden rapor edilmektedirler (2, 4-13). Yuan ve ark (47) 1998'de Avrupa'daki 35 yoğun bakım ünitesinden izole edilen 966 *Klebsiella*'nın % 23'ünde GSBL üretimi belirlemişlerdir. Polonya'da Varşova hastanelerinde GSBL moniterizasyonu bilim adamları tarafından düzenli bir şekilde yapılmaktadır. Polonyalı araştırıcılar 1998'te *Klebsiella* spp. salgınlarında bir pediatri hastanesinde baskın olarak TEM-47 ve SHV-5'in (48), 2 sene sonra yerini bir mutant olan TEM-68 'e (49) bıraktığını rapor etmişlerdir.

Tünger ve ark. (50) *E. coli*'lerin 69/320'sinin (% 21.5), *Klebsiella*'ların 71/144'ünün (% 49.3) GSBL ürettiğini belirlemişlerdir. Akay ve ark (51) nozokomiyal enfeksiyonlardan izole ettikleri enterik bakterilerden β-laktamaz üreten 21 *E. coli*'de GSBL üretimine rastlamamışlar, *Klebsiella*'ların % 11'inde, *Enterobacter*'lerin ise % 8'inde GSBL üretimi belirlemişlerdir. Yıldız ve ark. (52) izole ettikleri 531 enterik bakterinin % 13.1 'inde ÇDS testiyle GSBL pozitifliği belirlemişlerdir. Araştırıcılar % 12.5 oranında *E. coli*'lerin, % 60.26 oranla *Klebsiella* spp.'lerin ve % 16.6 oranla *Enterobacter*'lerin GSBL ürettiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma tüm suşlar arasında % 19.54'lük GSBL pozitiflik oranıyla Yıldız'ın çalışmasına uyum göstermektedir. Fakat araştırıcıların izole ettikleri *Klebsiella*'lardaki % 60'tan fazla GSBL üretim oranına bu çalışma sonuçları paralellik göstermemektedir. Pai'nin çalışmasında (53) *E. coli*'lerde % 4.8-7.5, *Klebsiella*'larda % 22.5 oranında GSBL üretimi tespit etmişlerdir. Saurina

ve ark. (54) Brooklyn'deki 15 hastaneden izole edilen enterobakteriyel türlerden *Klebsiella*'ların % 44'ünde, *P. mirabilis*'lerin % 9.5'inde, *E. coli*'lerin % 9.5'inde GSBL üretimi belirlemişlerdir. Bujdáková ve ark (13) 50 seftazidim dirençli enterobakterinin % 26'sında GSBL varlığı rapor etmişlerdir. Günseren ve ark. (55) seftazidim dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'leri arasında sırasıyla % 12.1 ve % 61.8 oranında GSBL pozitifliği bulmuşlardır. Emery ve ark (56) *Enterobacteriaceae*'lerin 50/3273'ü gibi çok az bir oranla (% 1.5) GSBL ürettiğini belirtmişlerdir. Yagi ve ark (57) Japonya'da çalışmaları süresince % 90 oranında GSBL'li suşa rastlamışlardır. Bu çalışmada *E. coli*'lerin 13/61'inin (% 21..31), *Klebsiella*'ların 11/42'sinin (% 26.19) ve *Enterobacter*'lerin 2/17'sinin (% 11.76) GSBL ürettiği bulundu. GSBL'li türlerin 17/20'sinde seftazidim direnci, 16/20'sinde ise aztreonam direncine rastlandı (Tablo 22). Türk Antimikrobiyal Direnç Çalışma Grubu (58) 1999'da araştırdıkları *Klebsiella* spp.'lerinin % 60.5'inin, *E. coli*'lerin % 22.5'inin GSBL ürettiğini rapor etmişlerdir. GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp'lerde % 0 ile % 71.4 oranında geniş spektrumlu sefalosporin ve monobaktam direnci belirlemişlerdir.

Chanal ve ark (59) 1990 yılında Fransa'da *Enterobacteriaceae*'de TEM-türevi GSBL'lerin %48. 6 oranla baskınken, 1994'te yerini % 56 oranla SHV varyantlarına bıraktığını rapor etmişlerdir. De Champs ve ark. (60) Fransa'da 1999 yılında 3 ayda topladıkları GSBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının 74/79'unda TEM türevi, 4/79'unda SHV türevi GSBL belirlemişlerdir. Bu çalışmada 2 ayda toplanan izolatlar arasında GSBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının 11/20'sinde TEM ve SHV türevi 6/20'sinde sadece SHV-türevi GSBL'ler belirlendi (Tablo 14).

Gaillot ve ark. (61) Fransa'da ilk olarak SHV-5 GSBL üreten *K. pneumoniae* salgınının 1998'de Paris'teki bir kadın doğum bölümünde olduğunu ve kontamine edilmiş ultrasonografi jellerinden orijin aldığını rapor etmişlerdir. Laksai ve ark. (62) İtalya'da 2000 yılında ilk SHV-12 tipi GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatında konjugatif olmayan 14 ve 16 kb'lik plazmitlerde rastlamışlardır.

West (63) *Klebsiell*a spp.'lerin en sık GSBL üreten enterobakterilerden biri olduğunu, aminoglikozid ve diğer antibiyotik direnç genlerini kodlayan büyük moleküler ağırlıklı konjugatif plazmidlerini *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* türlerine transfer edebileceğini rapor etmiştir. Bu çalışmada GSBL üreten suşların 19/20'sinde (% 95) aminoglikozid direncine rastlandı (Tablo 22). Sadece 1 suşta (*K. oxytoca* TRE082) amikasin direnci mevcuttu fakat konjugatif plazmidi tarafından kodlanmadığı tespit edildi. Bu suş nonepidemik bir plazmid taşıyordu (Tablo 21). Aminoglikozid dirençli 10 suşun transkonjugantları da aminoglikozid direncine sahipti (Tablo 16-21). On dört tetrasiklin dirençli suşun 3 tanesi bu direncini J53-2'ye transfer etti. C-2 grubu epidemik plazmid taşıyan iki *K. pneumoniae* (TRE044 ve TRE165), bir *E. coli* (TRE153) suşu pediatri yoğun bakım ve süt çocuğu servisindeki hastalardan izole edildiler. Moleküler büyüklükleri 87.8 (C-2 grubu) ve 93.1 (C-1 grubu) olan plazmidler TEM ve SHV-tipi gen taşıyorlardı ve hepsinde hibridizasyonla 20, 18, 13 ve 4.1 kb'lik restriksiyon fragmanlarına bla_{TEM} probu, 18.5, 13.5 ve 4.8 kb'lik fragmanlarına bla_{SHV} probları hibridize oldu. On altı suş trimetoprim/sülfometaksazola dirençli bulundu fakat bu direnci konjugatif olarak aktaran 4 suşa rastlandı. Bu suşlardan ikisi 27.4 kb'lik E grubu epidemik plazmid (pTRE40 ve pTRE73) içeriyordu. Diğer ikisi ise 39 kb'lik G (pTRE82) ve 58.6 kb'lik H grubu (pTRE146) nonepidemik plazmidler içeriyordu. Epidemik E grubu plazmidler sadece SHV-tipi GSBL kodluyordu ve 5.5 kb'lik restriksiyon fragmanına bla_{SHV} probu hibridize oldu. Nonepidemik G ve H grubu plazmidlerden G grubu TEM ve SHV-tiplerinin ikisini kodluyordu ve bla_{TEM} probu 16 kb'lik restriksiyon fragmanına, bla_{SHV} probu 4.9 kb'lik fragmanına hibridize oldu. H grubu plazmid ise sadece SHV tipi gen kodluyordu ve bla_{SHV} probu 23 kb'lik büyük bir fragmana hibridize oldu (Tablo 15). Epidemik olan E grubu plazmidler (pTRE40 ve pTRE73) pediatri adelösan servisi ve pediatri yoğun bakımdaki hastaların idrar ve kan örneklerinden izole edilen suşlarda taşınıyordu (Tablo 10).

Kim (64) ve ark. Kore'de GSBL'li *Klebsiella*'ların % 74'ünün SHV-tipi β-laktamaz ürettiklerini belirtmişlerdir. Yang ve ark. (65) Missouri'de *Klebsiella* spp.

ve *E. coli* türlerinde TEM-10 ve TEM-43 tipi GSBL'lerin yaygın olduğunu rapor etmişlerdir. Araque ve ark. (66) Venezüella'da nozokomiyal *K. pneumoniae* izolatlarında hem TEM hem de SHV türevi GSBL üretimi belirlemişlerdir. Avrupa hastanelerinde % 8 ile % 30 arasında değişen oranlarla seftazidime dirençli *K. pneumoniae* rapor edilmiştir (6). Blahova ve ark. (67) Çekoslovakya'da 1996'dan beri artan bir şekilde GSBL'li nozokomiyal *Klebsiella*'ların ortaya çıktığını ve özellikle seftazidim, sefotaksim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu β-laktam dirençlerini konjugatif plazmidlerleri ile yaydıklarını belirtmişlerdir. Pena ve ark (68) İspanya'da 1993 ile 1995 yılları arasında hastaneye yatan hastaların % 35'inde GSBL'li *Klebsiella*'ların enfeksiyon etkeni olduğunu belirtmişlerdir. Fakat oksiimino penisilin kısıtlamasıyla bir sene içinde anlamlı ölçüde GSBL'li *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında azalma tespit etmişlerdir. Shannon ve ark (69) İngiltere'de 1991 ile 1994 arasında 10 farklı GSBL üreten *K. pneumoniae* salgınları belirlemişlerdir. Bu salgınlarda transfer edilebilir 70-160 kb büyüklüğünde plazmidlerin GSBL kodladığını ve restriksiyon enzim kesim paternlerinin farklı olduğunu rapor etmişlerdir. Salgınlarda SHV-2, SHV-4, SHV-5, TEM-15 ve TEM-26 gibi farklı enzimlerin rol aldığını bulmuşlardır. Yan ve ark (70) Tayvan'da 234 GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarının 10'unda SHV-12, 4'ünde SHV-5 ve 2'sinde ne TEM ne de SHV-türevi belirlemişlerdir. Bu iki suşun yeni bir AmpC tipi olan CMY-8 tipinde plazmidle kodlanan GSBL geni olduğunu rapor etmişlerdir. Meyer ve ark (71) New York şehrindeki genel bir hastanedeki *K. pneumoniae* suşlarında % 17.3'lük seftazidim direnci belirlemişlerdir. Salgına yol açan suşlardaki direncin suşların ürettiği TEM-10 ve TEM-26'dan kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada GSBL üreten suşların 3/20'inde (% 15) TEM veya SHV dışında GSBL belirlendi fakat GSBL tipi araştırılmadı. (Tablo 14). Belçika'da kan örneklerinden izole edilen *Klebsi*ella'larda % 23.1 oranında, *E. coli*'lerde % 3.1 oranında GSBL üretimi tespit etmişlerdir. ÇDS testlerinde ise seftazidim, seftriakson, aztreonam ve sefepim kullanmışlardır ve dört indikatör antibiyotiğin de aynı hassasiyetle GSBL üretimini gösterdiğini bulmuşlardır (72). Bu çalışmada

kullanılan indikatör antibiyotiklerden sefotaksim 20 suşun hepsinde GSBL üretimini gösterdi. Kullanılan diğer indikatör antibiyotiklerden seftazidim 6/20'sini, seftriakson 7/20'sini, aztreonam 8/20'sini ve sefepim ise 18/20'sini gösterdi.

Bonnet ve ark. (73) *P. mirabilis*'te TEM-1 ve TEM-2 penisilinazların yanında TEM-3, TEM-24, TEM-44 (IRT) TEM-66 ve üç inhibitör dirençli TEM-65, TEM-73 ve TEM-74 gibi TEM-tipi GSBL'ler belirlemiştir. İnhibitör direnci sağlayan GSBL'leri kodlayan konjugatif plazmidlerin moleküler ağırlıklarını genelde 120 ve 170 kb arasında bulmuşlardır. Chanal ve ark. (12) ise *P. mirabilis*'lerde penisilinazlar ve inhibitör dirençli enzimler yanında TEM-3 gibi GSBL'ler belirlemişlerdir. Bu çalışmada GSBL üreten *P. mirabilis* 'e rastlanmadı.

Tzelepi ve ark. (74) Yunanistan'da *E. coli*, *Klebsiella* ve *Serratia* türlerinde yüksek sıklıkta GSBL üretimi varken *Enterobacter* spp.'lerde prevalansın belli olmadığından yola çıkarak yaptıkları çalışmada, *E. cloacae* ve *E. aerogenes* suşlarında sırasıyla % 25 ve % 58 oranında GSBL üretimi belirlemişlerdir. Bu çalışmada izole edilen *E. aerogene*s'lerin (Tablo 7) 2/10'unda (% 20) GSBL üretimiyle *E. aerogene*s'ler açısından yukarıdaki çalışmayla paralellik gösterdiği kanısına varıldı. Fakat 4 *E. cloacae* suşunda GSBL üretimi belirlenmedi. İki *Serratia marscescens* türü çoklu antibiyotik direncine sahip olmasına rağmen GSBL negatiftiler.

GSBL üreten *Enterobacter* izolatları Fransa'da (75, 76, 77), Amerika Birleşik Devletleri'nde (40) ve İngiltere'de (78) izole edilmişlerdir. Bu bakteriler birçok GSBL (TEM-3, TEM-10, TEM-12, TEM-24 ve TEM-26) kodlayan büyük plazmidler içerdiği, ayrıca bu plazmidlerin bazılarının aminoglikozid, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci kodladığını rapor etmişlerdir (74, 75, 76). GSBL üretimi indüklenebilir grup 1 β-laktamaz üretmeyen *K. pneumoniae* ve *E. coli* gibi *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde çok sık rastlanmaktadır (2). Pitout ve ark. (79) bir hastanede birçok GSBL'li *E. aerogenes* türlerinin izole edilmesinin çok nadir bir durum olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırıcılar izole ettikleri 31 *E. aerogenes*'in 29'unda SHV-4, 1'inde SHV-3,

1'inde SHV-5 belirlemişlerdir. Üç farklı GSBL kodlayan plazmidi *E. coli* C600N'ye konjugasyonla aktararak bu enzimlerin farklı büyüklükte plazmidlerce kodlandığını belirlemişlerdir. Transkonjugantlarının standart disk difüzyon testiyle plazmidlerin aminoglikozid ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci gösterdiğini rapor etmişlerdir. Shebabi ve ark (80) Ürdün'deki üç farklı yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *Enterobacter* spp.'lerinin % 30 ile % 62 arasında, *Klebsiella*'ların ise % 30 ile % 80 arasında GSBL ürettiklerini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada izole edilen *E. aerogenes*'lerden biri toplum kaynaklı enfeksiyondan (TRE088), diğeri (TRE164) enfeksiyon servisinde yatan bir hastadan izole edildi. TEM ve SHV tipi GSBL üreten suşların plazmidleri konjugatif olarak transfer olduğu J53-2'ye geniş spektrumlu β-laktam direnci (seftazidim ve aztreonam) yanında gentamisin direnci kazandırdı. Hastanemizde *K. pneumoniae, E. coli* türü haricinde *E. aerogenes* türlerinin de epidemik TEM ve SHV türevi GSBL kodlayan plazmidler taşıdığı ve bu plazmidlerin konjugatif olarak aynı ve farklı türler arasında paylaşılarak hastalar arasında yayıldığı gözükmektedir.

Fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak yapılan analizlerle çoklu direnç geni kodlayan ve epidemik konjugatif plazmidler içeren aynı veya farklı tür enterik patojenlerin genellikle pediatri ünitelerindeki hastaların enfeksiyon etkenleri olduğu ve hızlı bir şekilde konjugatif plazmidlerini paylaşıldığı kanısına varıldı. Jacoby (3) GSBL'ler ile ilgili yaptığı bilimsel derlemede genelde hastane personelinin ellerinin GSBL'li suşları hastadan hastaya yayan aracılardan biri olduğunu vurgulamıştır.

Kadro yatak sayısı 600 olup, 01.01.2000 ile 31.12.2000 arasında 492'si kullanımda olan hastanemizin bütün bölümlerinde yatan hastalarda 1 yıl süre içinde tedavi ve profilaksi amacıyla toplam olarak 19.4 kg inhibitörlü β-laktamlar (17. 6 kg ampisilin/sulbaktam ve 1.8 kg amoksisilin/klavulanat), 31.6 kg geniş-spektrumlu sefalosporinler (21.6 kg seftriakson, 1.4 kg seftazidim, 3.3 kg sefotaksim ve 5.3 kg sefepim) ve 0,36 kg aztreonam kullanılmıştır. Hastanemizde 1 yıl içinde böylesine yoğun antibiyotik kullanımından kaynaklanan selektif baskıların, enterobakterilerdeki konjugatif plazmidlerin kodladığı direnç genlerinin

evolüsyonuna ve türler arasında yayılmasına neden olan önemli faktörlerden biri olduğu kanısına varıldı. Bunun yanında hastane içindeki plazmid epidemilerinde enfeksiyon etkeni bakterilerden izole edilen GSBL kodlayan plazmitlerde hem TEM hem de SHV-tip genlerin tespit edilmesinin, bakterilerin selektif baskılara karşı bir adaptasyonu olabileceğini düşündürdü.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. İki ay boyunca poliklinik ve yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden (idrar, trakeal aspirat, yara, BOS, şant, kan, kateter ve çeşitli sürüntü örnekleri) izole edilen bütün enterobakteriler çalışmaya alındı ve 176 *Enterobacteriaceae* izolatı arasında % 53.40 *E. coli*, % 23.86 *Klebsiella* spp., %11.93 *Proteus* spp., % 9.65 *Enterobacter* spp. ve % 1.13 oranında *Serratia* spp. izole edildi. En sık enfeksiyon etkenleri *E. coli*'yi takiben *Klebsiella*'lardı.

2. İzole edilen 176 *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin 133'ü (% 75.56) NCCLS kriterlerine göre ampisiline dirençliydi (≥ 32µg/mL). Bu yüzden plazmid aracılı TEM ve SHV tipi β-laktamazların moleküler epidemiolojik araştırması kapsamına alındılar.

3. Konjugasyon deneylerinde 26 (% 19.54) enterobakterinin ampisilin direncini konjugasyonla hassas bir laboratuar suşu olan *E. coli* J53-2'ye 10^{-4} ile 10^{-8} arasındaki etkinlikle transfer etti. Yirmi suşun trankonjugantından izole edilen plazmidlerin restriksiyon analizleri yapılabildi. Konjugatif plazmidler 6.7 ile 93.1 kb arasındaydılar.

4. Plazmid DNA'larının *Eco*RI restriksiyon enzim paternleri değerlendirilerek A, B, C, D ve E grupları kendi aralarında epidemik, F, G, H, I, J, K ve L grupları nonepidemik plazmidler olarak gruplandırıldı.

5. A grubu, B-1 grubundan bir plazmid, C grubu ve E grubu plazmidleri pediatri ile ilgili servisler ve yoğun bakımlarındaki hastaların enfeksiyon etkenleri taşıyordu. B-1 grubunun diğer plazmidini enfeksiyon servisindeki bir hastanın enfeksiyon etkeni taşıyordu. B-2 ve D grubu epidemik plazmidleri ise pediatri poliklinik hastalarının enfeksiyon etkenleri taşıyordu. Nonepidemik plazmidlerden F, G ve I grubu plazmidleri pediatri ile ilgili servislerdeki hastaların, H, K ve L grubu plazmidleri pediatri ile ilgili poliklinik hastalarının, J grubu plazmidi ise dahiliye sevisindeki bir hastanın enfeksiyon etkenleri taşıyordu.

6. Epidemik ve nonepidemik konjugatif plazmidleri taşıyan klinik suşlar ve transkonjugantlarının hepsi ÇDS testine göre GSBL üretmekteydi. Ampisilin dirençli 133 suşun 26'sında (% 19.54) GSBL üretimi belirlendi. Testlerde indikatör olarak kullanılan seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve sefepim içinden en iyi indikatör antibiyotiklerin sefotaksimden sonra sefepim olduğu sonucuna varıldı.

7. Transkonjugantların hücre lizatlarına uygulanan bla_{TEM} ve bla_{SHV}-spesifik PCR sonuçlarına göre; 20 konjugatif plazmidin % 30'unun SHV, % 55'inin TEM+SHV türevi GSBL kodladığı, % 15'nin ise TEM veya SHV-tipi olmayan bir GSBL kodladığı bulundu. Sadece TEM türevi GSBL üreten suşa rastlanmadı.

8. bla_{TEM} ve bla_{SHV} probları kullanılarak epidemik ve nonepidemik plazmid DNA'larının *Eco*RI kesim fragmanlarına uygulanan Southern hibridizasyonlarda PCR sonuçları ile uyumlu olarak; A, B, C, F ve G

gruplarının restriksiyon paternlerine *bla*$_{TEM}$ ve *bla*$_{SHV}$ problarının ikisi de hibridize olurken, E, H, I, J ve K gruplarına sadece *bla*$_{SHV}$ probu hibridize oldu. D ve L grubu plazmid fragmanlarına iki prob da hibridize olmadı. Problar plazmidlerin kodladığı GSBL genlerine göre aynı epidemik plazmid grupları içinde aynı restriksiyon fragmanlarına hibridize oldular.

9. GSBL üreten klinik suşların 15/20'si amoksisilin/klavulanata, 21/20'si sefazolin ve sefuroksime, 17/20'si seftazidim ve seftriaksona, 16/20'si sefotaksime ve aztreonama, 15/20'si sefepime dirençliydi. Diğer antibiyotik gruplarından amikasine 1/20'si, netilmisine 6/20'si, gentamisine 12/20'si, tetrasikline ve trimetoprim/sülfometaksazola 16/20'si, kloramfenikole ise 13/20'si dirençliydi. Bu antibiyotiklere dirençli suşların transkonjugantlarından 9/15'i amoksisilin/klavulanata, 20/20'si sefazoline ve sefuroksime, 15/17'si seftazidime, 13/16'sı sefotaksime, 13/17'si seftriaksona, 9/15'i sefepime, 14/15'i aztreonama dirençliydi. Diğer antibiyotik gruplarından 10/12'si gentamisine, 3/12'si tetrasikline ve 4/16'sı trimetoprim/sülfometaksazole dirençli bulundu. Amikasin, netilmisin ve kloramfenikol direncine rastlanmadı.

10. Hastanemizde iki ay boyunca izole edilen ampisilin dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarının % 19.54'ünün GSBL'li olması gelişmekte olan ülkelerden yapılan bir çok raporla uyumlu olarak bulundu. Bu oran GSBL'li suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler hariç β-laktam antibiyotiklerin kullanılmasının anlamsız olacağını göstermektedir. β-laktam antibiyotikler haricinde aminoglikozid, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfometoksazol gibi antibiyotiklerin, sıklıkla paylaşılan ve evolüsyona uğrayan GSBL genleri kodlayan plazmidlerde taşınması klinikte sık kullanılan antibiyotiklere karşı direncin kısa zamanda artabileceği haberini verdiği kanısına varıldı.

11. GSBL üreten suşların taşıdığı plazmidlerin moleküler epidemiolojik analizine göre hastanemizdeki pediatri ile ilgili servisler ve yoğun bakımlarında TEM ve SHV türevi enzim üreten suşlarda bu enzimleri kodlayan epidemik plazmidlerin bir epidemiye yol açtığı görülmektedir. Konjugatif plazmidlerin hastane dışı ve hastane içi enfeksiyon etkenlerinden izole edilmesi bu plazmidlerin akraba ve yakın türler arasında hızla yayıldığını ve paylaşıldığını göstermektedir. Ayrıca hastane üniteleri arasında bu plazmidleri içeren türlerin hastadan hastaya bulaştırıldığı kanısına varıldı. Bu suşların bulaşmasına primer olarak hasta bakıcı, hemşire ve klinisyen gibi hastane personellerinin elleri aracılık edebileceğinden dolayı, personelin özellikle el temizliğinde çok hassas olunması önerilebilir.

12. Hastanemiz ve yurdumuzdaki yataklı üniversite ile genel hastanelerde nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen çoklu ilaç direncine sahip, GSBL'li bütün enterobakterilerin her yıl moleküler yöntemlerle takip edilmesinin, bu suşların etken olduğu enfeksiyon hastalıklarının kontrol altında tutulması için alınacak önlemlere yönelik çalışmalara bilgi zemini oluşturacağı, ayrıca rasyonel antibiyotik kullanımı ve gereksiz antibiyotik tüketiminin engellenmesine yönelik çalışmaların direnç evolüsyonunu azaltacağı ve dolayısıyla etkili tedavinin başarılmasıyla ülkede iş ve ekonomik kaybın engelleneceği düşünüldü.

13. Bu çalışmada epidemik ve nonepidemik plazmidlerin çoğunun hem TEM hem de SHV-türevi GSBL kodladığı bulundu. Suşların ürettiği TEM ve SHV türevi enzimlerin izoelektrik noktalarının tespiti yapılarak tiplendirilmesi, böylece dominant GSBL tiplerinin belirlenmesi ve bu çalışmaların ülke çapında devamlı olarak monitörize edilmesi önerilebilir.

14. Hastanemizdeki salgınlarda dominant olarak rastlanan GSBL mutasyonlarını belirlemek için tam enzim genlerini içine alan primerler dizayn edilerek gen ürünlerinin sekans analizleri yapılmalıdır.

15. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), ERIC-PCR ve AP-PCR gibi genomik yöntemlerin de bu gibi moleküler epidemiolojik çalışmalara eklenerek hastanemizde ve ülke çapındaki diğer hastanelerde salgınlara yol açabilecek bütün patojenlerin akrabalıklarının tespit edilmesi, böylece salgınların orijinlerinin belirlenerek kısa zamanda önlem alınması önerilebilir.

16. Kullanımdaki yatak sayısı 492 olan hastanemizin bütün bölümlerinde yatan hastalarda 01.01.2000 ile 31.12.2000 arasındaki 1 yıl süre içinde tedavi ve profilaksi amacıyla toplam olarak 19.4 kg inhibitörlü β-laktamlar, 31.6 kg geniş-spektrumlu sefalosporinler ve 0,36 kg aztreonam kullanılmıştır. Direnç genlerinin evolüsyonuna ve türler arası yayılmasına neden olabilecek bu ortamın minimuma indirilmesinin, rasyonel antibiyotik kullanımıyla ve gereksiz antibiyotik kullanımının engellenmesiyle başarılabilir.

7. ÖZET

Bu çalışmada KTÜ, Farabi Hastanesinde poliklinik ve yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden iki ay boyunca izole edilen 133 ampisilin dirençli *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinde TEM ve SHV tipi β-laktamaz enzimleri kodlayan plazmidlerin moleküler epidemiolojisi araştırıldı.

Ampisilin dirençli 133 suşun 26'sında (% 19.54) ve bu suşların transkonjugantlarında genişlemiş-spektrumlu β-laktamazlar tespit edildi. Konjugasyon deneylerinde 9 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. ve 2 *E. aerogenes*'in, 6.7 ile 93.1 kb arasındaki GSBL kodlayan plazmidlerini *E. coli* K-12 J53-2 laboratuar suşuna 10^{-4} ile 10^{-8} frekans arasında transfer ettiği belirlendi. β-laktamlar dışında aminoglikozid, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfometaksazol gibi antibiyotiklere dirençli transkonjugantların hücre lizatlarına uygulanan bla_{TEM} ve bla_{SHV}-spesifik PCR sonuçlarına göre % 30 SHV, % 55 TEM ve SHV ve % 15 ne TEM ne de SHV-türevi gen tespit edildi. Sadece TEM türevi gene rastlanmadı.

GSBL kodlayan plazmid DNA'larının *Eco*RI restriksiyon analizi ve bla_{TEM} ve bla_{SHV} problarıyla yapılan Southern hibridizasyon sonuçlarına göre A, B, C, D ve E olmak üzere 5 grup epidemik plazmid, F, G, H, I, J, K ve L olmak üzere 7 grup nonepidemik plazmid grubu belirlendi. PCR reaksiyonları ile uyumlu olarak bla_{TEM} ve bla_{SHV} probları aynı plazmid gruplarında aynı restriksiyon fragmanlarına hibridize oldular.

Bu çalışmadaki epidemik plazmidler hastanemizin farklı ünitelerindeki farklı hastaların enfeksiyon etkenlerinden izole edildiklerinden dolayı, hastanemizdeki enterik bakteriler arasında hem TEM ve SHV genlerine sahip konjugatif plazmid epidemileri olduğu sonucuna varıldı.

GSBL'li suşların hastadan hastaya bulaşmasına aracılık eden personelin ellerinin temizliğinde daha hassas olması ve GSBL üreten çoklu ilaç dirençli bakterilerin takibi için yurt çapında moleküler epidemiolojik çalışmaların arttırılması gerektiği kanısına varıldı. Daha da önemlisi, bu problemin kontrol altında tutulması acilen ülke çapında gereksiz antibiyotik kullanımının engellenmesine ihtiyaç göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*, GSBL, TEM ve SHV.

8. SUMMARY

Molecular epidemiology of the plasmids encoding TEM or SHV-types of β-lactamase enzymes in 133 of ampicillin resistant members of *Enterobacteriaceae* family isolated from various clinical materials obtained from both outpatients and inpatients into two months in Farabi Hospital of Karadeniz Technical University was investigated in this study.

Among ampicillin resistant strains, it was determined that 26 isolates (19.54 %) and their transconjugants produced extended-spectrum β-lactamases (ESBL). In conjugation experiments, 9 *E. coli*, 9 *Klebsiella* spp. and 2 *E. aerogenes* isolates were detected to transfer their ESBL-encoding plasmids, ranging from 6.7 to 93.1 kb in molecular size, to a susceptible laboratory strain of *E. coli* J53-2. According to the results of bla_{TEM} and bla_{SHV}-specific PCRs, among 20 transconjugants encoding resistance of aminoglycoside, tetracycline and trimethoprim/sulfomethaxazole other than β-lactam resistance, 30 % had SHV, 55 % had both TEM and SHV, and 15 % had non-TEM or non-SHV-derived genes. Only TEM-derived genes were not determined. According to the analysis of plasmids digested with *Eco*RI restriction enzyme and the results from Southern hybridization assays using bla_{TEM} and bla_{SHV} probes, conjugative plasmids were grouped as epidemic (A, B, C, D and E groups) and non-epidemic (F, G, H, I, J, K and L groups). bla_{TEM} and bla_{SHV} probes hybridized to the same restriction fragments in the same groups of plasmids.

Because the epidemic plasmids in this study were isolated from the enterobacteria which were the infectious agents of different patients in various units of our hospital, it was concluded that there were the epidemics of various conjugative plasmids with both TEM and SHV-derived ESBLs among enterobacteria in our hospital.

It would be suggested that the hygiene of the hands be considered important by our hospital personels, and also it is urgent that such molecular epidemiological studies be spread around the country in order to moniterize ESBL-producing organisms with multiple-drug resistance. More importantly, control of this problem urgently requires coordinating antibiotic use strategies including the limitation of unnecessary antibiotic use around the country.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, ESBL, TEM and SHV.

9. KAYNAKLAR

1. Petrosino, J., Cantu, C. III, and Palzkill, T.: *β*-lactamases: protein evolution in real time. *Trends in Microbiology*, 6: 323-327, 1998.

2. Jacoby, G.A., and Medeiros, A. A.: More extended-spectrum *β*-lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 35: 1697-1704, 1991.

3. Jacoby, G. A.: Extended-spectrum *β*-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-β-lactams. *Infectious Disease Clinics of North America*., 11: 875-886, 1997.

4. Arlet, G., Rouveau, M., Casin, I., Bouvet, P. J. M., Lagrange, P. H. and Philippon, A.: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 *β*-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J. Clin. Microbiol.,* 32: 2553-2558, 1994.

5. Gür, D., Ünal, S. and Akalın H. E.: Resistance patterns in Turkey. *Int. Journal. Antimicrob. Agents*., 6: 23-26, 1995.

6. Livermore, D. M. and Yuan, M.: Antibiotic resistance and production of extended-spectrum *β*-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J. Antimicrob. Chemother*., 38: 409-424, 1996.

7. Pitout, J. D. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Moland, E. S. and Sanders, C. C.: *β*-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 42: 1350-1354, 1998.

8. Stobberingh, E. E., Arends, J., Hoogkamp-Korstanje, J. A. A., et al.: Occurence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in Dutch hospitals. *Infection*., 27: 348-354, 1999.

9. Palucha, S., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M.: Concurrent outbreaks of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *J. Antimicrob. Chemother*., 44: 489-499, 1999.

10. Wiener, J., Quinn, J. P., Bradford, P. A., Goering, R. V., Nathan, C., Bush, K., and Weinstein, R. A.: Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA*., 281: 517-523, 1999.

11. Babini, G. S., and Livermore, D. M.: Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob. Chemother*., 45: 183-189, 2000.

12. Chanal, C., Bonnet, R., De Champs, C., Sirot, D., Labia, R., and Sirot, J.: Prevalence of *ß*-lactamases among 1,072 clinical strains of *Proteus mirabilis*: a 2-year survey in a French hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 44: 1930-1935, 2000.

13. Bujdáková, H., Klimáčková, J., Allerberger, F., Morávčíková, M., Bagová, M. et al: Spectrum and transferability of *ß*-lactam resistance in hospital strains of *Enterobacter* isolated in Bratislava and Innsbruck. *Int. J. Antimicrob. Agents*., 16: 31-36, 2000.

14. Novick, R. P.: Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev*., 51: 381-395, 1987.

15. Waters, V. L.: Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*., 4: d416-439, 1999.

16. Baquero, F., Negri, M.C., Morosini, M.I., and Blazquez, J.: Antibiotic-selective environment. *Clin. Infect. Dis.*, 27 (Suppl 1): S5-11, 1998.

17. National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) (1997) *Performance Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approval Standart M2-A6*. Wayne, PA: NCCLS.

18. Kayaalp, S. O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. VIII. Baskı. Hacettepe-Taş, Ankara, pp. 201-239, 1998.

19. Bryan, L.E., Godfrey, A.J.: *ß*-lactam antibiotics: Mode of action and bacterial resistance. *In*: Lorian, V. (Ed.), 3rd. ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams &Wilkins. Baltimore, USA, 1991.

20. Pitout, J., Sanders, C. C., and Sanders, W. E.: Antimicrobial resistance with focus on β-lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am. J. Med*., 103: 51-59, 1997.

21. Livermore, D. M.: *ß*-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-584, 1995.

22. Thomson, K. S., and Moland, E. S.: Version 2000: the new *ß*-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millenium. *Microbes and Infection*, 2: 1225-1235, 2000.

23. Bush, K., Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A.: A functional classification scheme for *ß*-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 39: 1211-1233, 1995.

24. Livermore, D. M.: Mechanisms of resistance to *ß*-lactam antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis.*, (Suppl) 78: 7-16, 1991.

25. Knox, J. R.: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type *ß*-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 39: 2593-2601, 1995.

26. Medeiros, A. A., Mayer, K. H. and Opal, S. M.: Plasmid-mediated beta-lactamases. *Antibiot. Newslett.*, 5: 61-65, 1988 *In*: Bryan, L.E., Godfrey, A.J.: *ß*-Lactam Antibiotics: Mode of action and bacterial resistance. *In:* Lorian, V. (Ed.), 3rd. ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins. Baltimore, USA, 1991.

27. Bush, K. and Jacoby, G.: Nomenclature of *ß*-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 39: 1-3, 1997.

28. Heritage, J., M'Zali, F. M., Gascoyna-Binzi, D., and Hawkey, P. M.: Evolution and spread of SHV extended-spectrum *ß*-lactamases in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 44: 309-318, 1999.

29. Jacoby, G. A, Bush, K.: Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum *ß*-lactamases. Accessed May 2001. Available at http://www.lahey.org/studies/webt.htm.

30. Prinarakis, E. E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M., and Tzouvelekis, L. S.: Emergence of an inhibitor-resistant *ß*-lactamase (SHV-10) derived from a SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41: 838-840, 1997.

31. Sirot, D., Recule, C., Chaibi, E. B., Bret, L., Croize, J., Chanal-Claris, C., Labia, R., and Sirot, J.: A complex mutant of TEM-1 *ß*-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia c*oli clinical isolate. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41: 1322-1325, 1997.

32. Philippon, L. N., Naas, T., Bouthors, A., Barakett, H., and Nordmann, P.: OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum *ß*-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemoth*er., 41: 2188-2195, 1997.

33. Zatyka, M., and Thomas, C. M.: Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol. Rev*., 21: 291-319, 1998.

34. Monroe, S., and Polk, R.: Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 496-501, 2000.

35. Bhavnani, S. M.: Antimicrobial usage and resistance problems: suveillance issues and a strategy for the future. *Antimicrob. Infect. Dis. Newslett*., 17 (6): 41-48, 1998.

36. Weinstein, R. A.: Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. *Emer. Infect. Dis*., 7: 188-192, 2001.

37. Brenner, D. J.: Facultatively anaerobic gram-negative rods *In*: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 (N. R. Krieg and J. G. Holt eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 408-516, 1986.

38. Yu, P. K. W., and Washington, J. A.: Identification of aerobic and facultatively anaerobic bacteria, Section 4.2, pp 131-250 *In*: Washington, J. A.: *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. 2nd. ed., Springer-Verlag, New York, 1985.

39. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., and Philippon, A.: Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer *ß*-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis*., 10: 867-878, 1988 *In*: Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A., and Tsakris.: A: Detection of extended-spectrum *ß*-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 542-546, 2000.

40. Rice, L. B., Willey, S. H., Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., Eliopoulos, G. M., Moellering Jr., R. C., and Jacoby, G. A.: Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum *ß*-lactamases at Massachusetts chronic care facility. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 34: 2193-2199, 1990.

41. Ausubel, F. M., Brient, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K.: *Short Protocols in Molecular Biology*. 2 nd ed. John Willey & Sons., New York ,1995.

42. Arlet, G., and Philippon, A.: Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable *β*-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Letts.,* 82:19-26, 1991.

43. Drago, L., Mombelli, B., De Vecchi, E., Tocalli, L., Nardi, G., Gismondo, M. R.: Epidemiology of Gram-negative antibiotic resistance in outpatients: a year of surveillance. *Int. J. Antimicrob. Agents*., 16: 479-481, 2000.

44. Zsuzsanna, G., Szabó, D., Kovács, P., Hernádi, F., Tóth-Martinez, B., and Rozgonyi, F.: β-lactam susceptibility patterns and investigation of cephalosporin hydrolysing *β*-lactamases of Gram-negative extraintestinal clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents*., 16: 395-400, 2000.

45. Bermudes, H., Arpi, C., Jude, F., El-Harrif, Z., Bebear, C., and Quentin, C: Molecular epidemiology of outbreake due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16: 523-529, 1997.

46. Prodinger, W. M., Fille, M., Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Amann, S., Pfausler, B., Las-Flörl, C., and Dierich, P.: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamases: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J. Clin. Microbiol*., 34: 564-568, 1996.

47. Yuan, M., Aucken, H., Hall, L. M. C., Pitt, T. L., and Livermoore, D. M.,: Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum *β*-lactamases from European intensive care units. *J. Antimicrob. Chemother*., 41: 527-539, 1998.

48. Gniadkowski, M., Palucha, A., Grzesiowski, P., and Hryniewicz, W.: Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum *β*-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 42: 3079-3085, 1998.

49. Fiett, J., Palucha, A., Miaczyńska, B., Stankiewicz, M., Przondo-Mordarska, H., Hryniewcz, W., and Gniadowski, M.: A novel complex mutant *β*-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum *β*-lactamase-producing klebsiellae. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 44: 1499-1505, 2000.

50. Tünger, A., Hilmioğlu, S., Dibek, M. A., Çavuşoğlu, C., Aktaş, L., Özkan, F. ve Özinel, M. A.: Hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı. *İnfeks. Derg*., 12: 165-168, 1998.

51. Akay, H., Özkan, S., Sultan, N., Kuştimur, S. ve Çırak, M.: Extended-spectrum beta-lactamase activity (ESBL) in Gram-negative bacteria isolated from nosocomial infections. *Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg*., 27: 37-39, 1997.

52. Yıldız, Ü., Durmaz, G., Us, T. ve Akgün, Y.: Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan enterik bakterilerin meropenem, imipenem, sefodizim ve sefepim duyarlılıkları. *İnfeks. Derg*., 14: 373-377, 2000.

53. Pai, H.: The characteristics of extended-spectrum *β*-lactamases in Korean isolates of *Enterobacteriaceae*. *Yonsei Med. J*., 39: 514, 1998.

54. Saurina, G., Quale, J. M., Manikal, V. M., Oydna, E., and Landman, D.: Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *J. Antimicrob. Chemother*., 45: 895-898, 2000.

55. Günseren, F., Mamıkoğlu, L., Öztürk, S., et al.: A surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother*., 43: 373-378, 1999.

56. Emery, C. L., and Weymouth, L. A.: Detection and clinical significans of extended-spectrum *β*-lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol*., 35: 2061-2067, 1997.

57. Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, H., and Arakawa, Y.: A preliminary survey of extended-spectrum *β*-lactamases *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett*., 184: 53-56, 2000.

58. Pfaller, M. A., Korten, V., Jones, R. N., Doern, G. V., and the Turkish Antimicrobial Resistance Study Group: Multicenter evaulation of the antimicrobial activity for seven broad-spectrum *β*-lactams in Turkey using the Etest method. *Diagn. Microbial. Infect. Dis*., 35: 65-73, 1999.

59. Chanal, C., Sirot, D., Romazsko, J. P., Bret, L., and Sirot, J.: Survey of extended spectrum *β*-lactamases among *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother*., 38: 127-132, 1996.

60. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., Sirot, J., and The French Study Group.: A 1998 survey of extended-spectrum *β*-lactanases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 44: 3177-3179, 2000.

61. Gaillot, O., Maruéjouls, C., Abachin, É., Lecuru, F., Arlet, G., Simonet, M., and Berche, P.: Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum *β*-lactamase, originatin from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol*., 36: 1357-1360, 1998.

62. Laksai, Y., Severino, M., Perilli, M., Amicosante, G., Bonfiglio, G., and Stefani, S.: First identification of an SHV-12 extended-spectrum *β*-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. *J. Antimicrob. Chemother*., 45: 349-351, 2000.

63. West, P. W.,: Extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Klebsiella* spp. *Bri. J. Biomed. Science*., 57: 226-233, 2000.

64. Kim, J., Kwon, Y., Pai, H., Kim, J-W., and Cho, D-T.: Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum *β*-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J. Clin. Microbiol*., 36: 1446-1449, 1998.

65. Yang, Y., Bhachech, N., Bradford, P. A., Jett, B. D., Sahm, D. F., and Bush, K.: Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 *β*-lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 42: 1671-1676, 1998.

66. Araque, M., Nieves, B., Lauretti, L., Rossolini, G. M.: Molecular basis of extended-spectrum *β*-lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. *Int. J. Antimicrob. Agents*., 15: 37-42, 2000.

67. Blahová, J., Králiková, K., Krčméry, V., and Toršová, V.: Transfer of resistance and production of extended-spectrum *β*-lactamase (ESBL) in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains from two hospitals in Czech Republic. *Zbl. Bakt*., 286: 449-455, 1997.

68. Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallares, R., Liñares, J., Ariza, J., and Gudiol, F.: Epidemiology and successful control of outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum *β*-lactamases, *Antimicrob. Agents. Chemother*., 42: 53-58, 1998.

69. Shannon, K., Stapleton, P., Xiang, X., et al.: Extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol*. 36: 3105-3110, 1998.

70. Yan, J-J., Wu, S-M., Tsai, S-H., Wu, J-J., and Su, I-J.: Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum *β*-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 44: 1438-1442, 2000.

71. Meyer, K. S., Urban, C., Eagan, J. A., and Berger, B. J.: Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann. Intern. Med*., 119: 353-358, 1993.

72. Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C. C., and Goossens, H.: Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum *β*-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol*., 35: 2191-2197, 1997.

73. Bonnet, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Labia, R., and Sirot, J.: Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 43: 2671-2677, 1999.

74. Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A., and Tsakris.: A: Detection of extended-spectrum *β*-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 542-546, 2000.

75. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, M.-C., Dumas, M.-P., and Sirot, J.: Concomitant dissemination of three extended-spectrum *β*-lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a France hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 27: 441-457, 1991.

76. De Champs, C., Sauvant, M. P., Chanal, C., Sirot, D., Gazuy, N., Malhuret, R., Baguet, J. C., and Sirot, J.: Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum *β*-lactamase-producing members of the familiy *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol*., 27: 2887-2890, 1989.

77. Goldstein, F. W., Péan, Y., Rosato, A., Gertner, J., Gutmann, L., and the Virgil'Roc Study Group: Characterization of ceftriaxone-resistant *Enterobacteriaceae*: a multicenter study in 26 French hospitals. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 32: 595-603, 1993.

78. Hibbert-Rodgers, L. C. F., Heritage, J., Gascoyne-Binzi, D. M., Hawkey, P. M., Todd, N., Lewis, I. J., and Bailey, C.: Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a pediatric oncology ward. *J. Antimicrob. Chemother*., 36: 65-82, 1995.

79. Pitout, J. D. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Coudron, P., and Sanders, C. C.: Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents. Chemother*., 42: 596-600, 1998.

80. Hebabi, A. A., Mahafzah, A., Baadran, I., Qadar, F., and Dajani, N.: High incidence of *Klebsiella pneumoniae* isolates to extended-spectrum β-lactam drugs in intensive care units. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., 36: 53-56, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Pazar (Rize)'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Pazar'da tamamladıktan sonra, 1987-1988 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 1992 yılında aynı bölümden "Biyolog" ünvanı ile mezun oldu. 1992 yaz yarıyılı eğitim-öğretim döneminde Milli Eğitim Bakanlığı, Pazar Kirazlı Köyü İlköğretim Okulu'nda ücretli Fen bilgisi öğretmeni olarak görev yaptı. 1992-1993 öğretim yılında KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. 1994 yılında aynı enstitüye bağlı bölümde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 1996 yılında "Uzman (Mikrobiyoloji)" ünvanı alarak eğitimini tamamladı. 1996-1997 öğretim yılında KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Programı'na başladı. 1998 yılında aynı enstitüye bağlı bölümde tekrar Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Doktora programından 26.06.2001 tarihinde mezun oldu. Evli ve 1 çocuk babasıdır.