



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



**ÇOKLU ANTİMİKROBİYAL DİRENÇLİ
ESCHERİCHIA COLI'DE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
β-LAKTAMAZ DİRENCİNİN KARAKTERİZASYONU**

Ulvi İBRAHİMLİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2019





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI



**ÇOKLU ANTİMİKROBİYAL DİRENÇLİ
ESCHERİCHIA COLI'DE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
β-LAKTAMAZ DİRENCİNİN KARAKTERİZASYONU**

Ulvi İBRAHİMLİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç.Dr. Murat CENGİZ

BURSA-2019

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

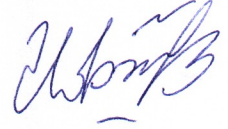
ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Çoklu Antimikrobiyal Dirençli *Escherichia Coli*’de Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz Direncinin Karakterizasyonu” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Ulvi İBRAHİMLİ

Tarih ve İmza

11.09.2019



KABUL ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ulvi İBRAHİMLİ tarafından hazırlanan “Çoklu Antimikrobiyal Dirençli *Escherichia Coli*’de Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz Direncinin Karakterizasyonu” konulu Yüksek Lisans tezi 11/09/2019 günü, 11:00 - 13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç.Dr. Murat CENGİZ	
Üye	Prof. Dr Songül SONAL	
Üye	Doç.Dr. Murat BOYACIOĞLU	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu’nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU11.09.2019**Adı Soyadı:** Ulvi IBRAHİMLİ**Anabilim Dalı:** Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji**Tez Konusu:** Çoklu Antimikrobiyal Dirençli *Escherichia Coli*'de Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz Direncinin Karakterizasyonu

ÖZELLİKLER	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç.Dr. Murat CENGİZ

İmza: 

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ	VIII
TÜRKÇE ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>E. coli</i> (Tarihcesi, Genel Özellikleri ve Tipleri).....	4
2.2. Antimikrobiyaller	6
2.3. β -Laktam Antimikrobiyaller.....	7
2.3.1. Penisilinler	8
2.3.2. Sefalosporinler	9
2.3.3. Monobaktamlar.....	10
2.3.4. Karbapenemler.....	10
2.3.5. β -Laktamaz İnhibitörleri	11
2.4. β -Laktam Antimikrobiyallere Karşı Direnç Gelişimi ve Direncin Mekanizmaları.....	11
2.4.1. β -Laktamazlara Bağlı Direnç.....	13
2.4.2. Hedef moleküllerinde oluşan değişikliklere bağlı direnç	13
2.4.3. Hücre içine girişinin engellenmesi ile oluşan direnç.....	14
2.4.4. Aktif pompa sistemi ile dışarı atılması yoluyla oluşan direnç.....	14
2.4.5. Çoklu İlaç Direnci (MDR).....	14

2.5. β -laktamazlar	15
2.5.1. β -laktamazlar Sınıflandırılması	16
2.6. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar (GSBL)	20
2.6.1. GSBL tipleri.....	22
2.6.1.1. TEM grubu enzimler	22
2.6.1.2. SHV gurubu enzimler	23
2.6.1.3. CTX-M gurubu enzimler	23
2.6.1.4. OXA Grubu.....	24
2.6.1.5. İnhibitörlere Dirençli β -laktamazlar	24
2.6.1.6. Diğer GSBL'ler.....	24
2.7. Antimikrobiyal Direncin İzlenmesi.....	25
2.7.1. Fenotipik Yöntemler	26
2.7.1.1. Disk Difüzyon.....	27
2.7.1.2. Gradient Difüzyon (E-test)	27
2.7.1.3. Agar Dilüsyon.....	27
2.7.1.4. Broth Mikrodilüsyon.....	27
2.7.2. Moleküler Yöntemler.....	28
2.7.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	29
2.7.2.2. PCR-RFLP (PCR Restriction fragment length polymorphism).....	29
2.7.2.3. Nükleotid Dizi Analizi (DNA sequencing).....	29
2.7.2.4. PCR-SSCP (PCR-Single-Strand conformational polymorphism analysis)	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> İzolatları	30
3.2. Fenotipik Yöntemler.....	32
3.2.1. Disk Difüzyon.....	32
3.2.1. Broth Mikrodilüsyon	32
3.3. Moleküler Yöntemler	33
3.3.1. Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu.....	33
3.3.2. PCR amplifikasyonu	34
3.3.2.1. blaSHV Geninin PCR amplifikasyonu	34

3.3.3. Jel Elektroforez ve Görüntüleme	35
3.3.3.1. AgaroZ Jel Hazırlama.....	35
3.3.3.1. Görüntüleme	35
4. BULGULAR	36
4.1. Hayvanlardan İzole Edilen <i>E. coli</i> 'nin Epidemiyolojik Olarak Tiplendirmesinin Yapılması	36
4.2. Fenotipik Tarama ve Doğrulama test sonuçları	36
4.2.1. Broth-mikrodilüsyon test sonuçlar	36
4.2.2. Disk difüzyon test sonuçları	41
4.3. Genotipik test sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR.....	50
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	58
8. TEŞEKKÜR.....	62
9. ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ

Şekil 1: β -laktamların molekül yapısı	7
Şekil 2: β -laktamaz inhibitörlerinin moleküler yapısı	11
Şekil 3: β -laktamazların etki mekanizması	17
Şekil 4: Broth-mikrodilüsyon testlerinde kullanılan seri dilüsyon	33
Şekil 5: Seftazidim ve sefotaksim için MİK dağılım grafikleri	37
Şekil 6: Broth-mikrodilüsyon yöntemine göre izolatların seftazidim ve sefotaksim antimikrobiyalarına direnç oranları	39
Şekil 7: Kirby-Bauer Disk Difüzyon test sonuçlarına göre <i>E. coli</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık oranları	41
Tablo 1: Mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç mekanizmaları	12
Tablo 2: β -laktamazların adlandırılmasına örnekler	16
Tablo 3: Amblere göre β -laktamaz sınıflandırması ve bulunduğu organizmalar	18
Tablo 4: Karşılaştırmalı olarak β -laktamazlar	19
Tablo 5: GSBL saptama yöntemleri	26
Tablo 6: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	31
Tablo 7: Hedef gen bölgelerine ait oligonükleotidler	34
Tablo 8: <i>bla_{SHV}</i> için termal program	34
Tablo 9: Broth-mikrodilüsyon yöntemine göre seftazidim ve sefotaksim için MİK dağılım yüzdeleri	38
Tablo 10: Broth-mikrodilüsyon yöntemine göre <i>E. coli</i> izolatların seftazidim ve sefotaksim antimikrobiyalarına dirençlilik paneli	40
Tablo 11: İzolatların GSBL test sonuçları	42

TÜRKÇE ÖZET

ÇOKLU ANTİMİKROBİYAL DİRENÇLİ *ESCHERİCHIA COLI*'DE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU β -LAKTAMAZ DİRENCİNİN KARAKTERİZASYONU

Bu araştırmanın amacı, çoklu antimikrobiyal dirençli (multidrug resistance: MDR) *Escherichia coli*'de (*E. coli*) geniş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize edilmesidir.

Sağlıklı ve enfeksiyon bulgusu gösteren hayvanlardan 112 *E. coli* izolatı seçilerek araştırmaya dahil edildi. İzolatların antimikrobiyal direnç profillerini belirlemek amacıyla fenotipik tarama ve doğrulama testleri, broth-mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri yapıldı. Genotipik testler ise PCR'la gerçekleştirildi. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşu olarak kullanıldı. Broth-mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) MİK değerleri ve disk difüzyon yöntemiyle ise bu ilaçların hem tek başına hem de klavulanik asit ilaçları ile kombinasyonlarının MİK değerleri CLSI'in (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

Broth-mikrodilüsyon testi sonucuna göre 92 izolat (%82,14) seftazidime duyarlıyken 2 izolat (%1,78) orta duyarlı, 18 izolat (%16,07) ise dirençli olarak belirlendi. Sefotaksim için bu değerler sırasıyla 45 izolat (%40,17) duyarlı, 35 izolat (%31,25) orta duyarlı ve 32 izolat (%28,57) ise dirençli olarak belirlendi. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan doğrulama testlerinde bir izolatın seftazidime (% 0.89) ve bir izolatın ise sefotaksime (% 0.89) dirençli olduğu tespit edildi. 111 izolatın her iki bileşiğe duyarlı olduğu ve hiç bir izolatın orta duyarlı olmadığı belirlendi.

CLSI'nin kriterlerine göre 1 adet izolat fenotipik olarak GSBL pozitif, 111 adet izolat ise GSBL negatif olarak değerlendirildi. Dirençli ve duyarlı bulunan *E. coli* izolatlarının GSBL varlığı, GSBL üretilmesinden sorumlu olan *bla* genlerinden *bla_{SHV}* geninin tespitine bağlı olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirildi. *bla_{SHV}* geninin hem GSBL pozitif hem de GSBL negatif *E. coli* izolatların hiçbirinde bulunmadığı belirlendi.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre dirençli ve MDR *E. coli* izolatlarının tek başına kullanılan β -laktam grubu bileşiklere karşı önemli düzeyde duyarlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir. Ancak GSBL nitelenmesi için gerekli olan klinik eşik değerlere sahip izolat sayısı çok düşüktür. Bu nedenle MDR ve GSBL arasında bağımlı ilişki değerlendirildiğinde GSBL varlığının her zaman MDR ile ilişkilendirilemeyeceği öngörülebilir.

Anahtar kelimeler: MDR, *E. coli*, GSBL, Antimikrobiyal direnç

İNGİLİZCE ÖZET

CHARACTERIZATION OF EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE RESISTANCE IN MULTIPLE DRUG RESISTANT *ESCHERICHIA COLI*

The aim of this study was to characterize the production extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in multidrug resistant (MDR) *Escherichia coli* (*E. coli*) by phenotypic and genotypic methods.

A total of 112 *E. coli* isolates with healthy and infectious findings were selected and included in the study. Phenotypic screening and validation tests were performed with broth-microdilution and disc diffusion methods to determine the antimicrobial resistance profiles of the isolates. Genotypic tests were performed with PCR. *E. coli* ATCC 25922 was used as control strain in antimicrobial susceptibility studies. MIC values of ceftazidime and cefotaxime drugs were evaluated by broth-microdilution method and disk diffusion method of these drugs both alone and in combination with clavulanic acid drugs (Clinical and Laboratory Standards Institute) were evaluated according to CLSI recommendations.

While 92 isolates (82.14%) were susceptible to ceftazidime, 2 isolates (1.78%) were medium sensitive and 18 isolates (16.07%) were resistant to broth microdilution test. For cefotaxime, 45 isolates (40.17%) were susceptible, 35 isolates (31.25%) were moderately sensitive and 32 isolates (28.57%) were resistant. One of the isolates was resistant to ceftazidime (0.89%) and one to cefotaxime (0.89%). 111 isolates were sensitive to both compounds and no isolates were moderately sensitive.

According to CLSI criteria, 1 isolate was phenotypically ESBL positive and 111 isolates were ESBL negative. The presence of ESBL in resistant and susceptible *E. coli* isolates was determined by polymerase chain reaction (PCR) for the blaSHV gene, one of the bla genes responsible for ESBL production. The blaSHV gene was found to contain none of the ESBL positive and ESBL negative *E. coli* isolates.

According to the results of this study, resistant and MDR *E. coli* isolates lost significant sensitivity to β -lactam group compounds used alone. However, the number of isolates with clinical thresholds required for ESBL characterization is very low. Therefore, when the dependent relationship between MDR and ESBL is evaluated, it can be predicted that the presence of ESBL is not always associated with MDR.

Keywords: MDR, *E. coli*, ESBL, Antimicrobial resistance

1. GİRİŞ

Hastane ve toplum enfeksiyonlarında *Enterobacteriaceae* ailesi tıbbi açıdan önemlidir. Bu ailenin üyeleri hayvan ve insanların bağırsak florasında, bitkilerde, toprak ve suda yaygın olarak bulunur ve birçok hastalık için risk faktörüdür (Bilgehan, 2000). *Enterobacteriaceae* ailesinin önemli bakterilerinden olan *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia* 'nın önemli enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Bir başka ifade ile *Enterobacteriaceae* ailesi klinik laboratuvarlarda en fazla izole edilen grubu oluşturur (Kıratisin ve Henprasert, 2010). *Escherichia coli* (*E. coli*) ise bu grubun en önemli bakterilerinden biridir. İzole edilen basillerin yaklaşık olarak %80'i *Enterobacteriaceae* ailesi üyesidir ve bunlar; gastroenteritlerin %65-70'inden, idrar yolu enfeksiyonlarının %70'den ve sepsislerin ise %50'sinden sorumludur (Brunder ve ark., 1997). Bunun dışında hastane enfeksiyonlarının da en büyük sorumlusu olarak kabul edilmektedirler (Yoldaş, 2007).

İlk defa infantların dışkıında izole edilen *E. coli*, yaygın olarak memelilerin ve kuşların bağırsak florasında doğal olarak bulunan bir bakteridir (Kucheri ve ark., 2005). İnsanların gastrointestinal sistemi için oldukça faydalı olan *E. coli* B ve K vitamini sentezindeki rolü nedeniyle de araştırmalara çok fazla konu olmaktadır (Akçam, 2004). Ancak *E. coli*'nin dışkıda bulunması içme ve kullanma suyuyla kirliliğe işaret ederken; araştırmalar *E. coli*'nin toksijenik/patojenik suşlarının bulunduğunu, içecek ve yiyecekler yolu ile alındığında zehirlenmelere, beyin ile böbrek hasarlarına ve hatta ölüm sebep olduğunu göstermiştir (Demir, 2006).

Enfeksiyonların tedavisinde genellikle β -laktam grubu antimikrobiyaller tek başına ya da kombine olarak kullanılmaktadır (Danel ve ark., 1995). Ancak son yıllarda profilaktik ve tedavi amacı ile antimikrobiyallerin yaygın ve yanlış kullanımı

β -laktamlara karşı direnç gelişimine neden olmuş ve bu durumda uygulanan tedaviler başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Lee ve ark., 2003). *E. coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde de sıklıkla β -laktamların kullanılması bakteriler arasında β -laktam direncinin yaygınlaşmasının nedenlerinden biridir. Direnç oluşumunun altında yatan mekanizmaların başında ise β -laktamaz enzimleri gelmektedir (Su ve ark., 2014).

β -laktamaz, 4 atomlu β -laktam halkasını hidrolize ederek ilacı inaktif hale getiren bir enzim olup, ilk β -laktamazlar I. Kuşak sefalosporinlerle penisilinleri aktif şekilde parçalayabildikleri halde, seftazidim, sefotaksim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu β -laktamlara karşı etkisizdirler (Livermore, 1995). 1980'li yıllardan sonra geniş spektrumlu β -laktamların yaygın bir şekilde kullanılmaları β -laktamaz enzimlerini kodlayan genlerde mutasyonlara ve buna bağlı olarak da “Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz (GSBL)” olarak adlandırılan yeni enzimlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Toplam 350 β -laktamaz enziminin yaklaşık 150'sini GSBL'ler oluşturmaktadır. (Bal, 2003) *E. coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda önemli sorunlar oluşturmaktadır (Pfaller ve Segret, 2006). GSBL üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda, hastanede kalış süresi uzayabilir ve yoğun bakım gereksinimi artabilir. Üriner veya venöz kateter gibi uygulamalar β -laktam kullanma ihtiyacını arttırdığından antimikrobiyal direnç gelişimi kolaylaşabilir (Romero ve ark., 2005).

GSBL'nin morbidite, mortalite ve tedavi maliyetleri bakımından önemli olumsuz sonuçları bulunmaktadır (Akova, 2004). Mikrobiyolojik açıdan bakteri duyarlılığının belirlenmesi için rutin izleme testleri yapılmasına rağmen, Türkiye'de veteriner hekimliği disipliniinde GSBL üreten bakterilerle ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bazı araştırmaların sonuçlarına göre fenotipik olarak GSBL'nin pozitif sonuç vermediği belirlenmiştir (Aksoy ve ark., 2005, Dinç ve ark., 2012)

GSBL yayılımının engellenmesindeki ilk basamak izolatlarda hangi tip GSBL'nin yaygın olduğunun belirlenmesi ve yayılma yolu ile hızının anlaşılmasıdır. Bu nedenle öncelikle izolatların içerdiği GSBL tipleri doğru olarak tanımlanmalıdır (Duman ve ark., 2010). β -laktamaz inhibitörlerine karşı GSBL duyarlılığı için;

kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E test® yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, üç boyutlu test, boronik asit yöntemi ve otomatize sistemler gibi doğrulama testleri yapılmaktadır (Pitout ve ark., 2005).

Antimikrobiyal direnç şu anda dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir ve çok az sayıda antimikrobiyal grubu kullanılabilir duruma gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (World Health Organization: WHO) göre, dünyanın her yerinde antimikrobiyal dirençli suşlar mevcuttur ve yeni direnç mekanizmaları küresel olarak ortaya çıkmaya ve yayılmaya devam etmektedir (WHO, 2014). Halk sağlığını korumak ve direnç faktörlerinin çevreye yayılmasını önlemek için antimikrobiyal direnç ile ilgili moleküler karakterizasyon çalışmaları detaylı olarak yürütülmelidir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı hayvanlardan izole edilen *E. coli*'de çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance: MDR) ile GSBL direncinin fenotip ve genotipini karakterize etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *E. coli* (Tarihçesi, Genel Özellikleri ve Tipleri)

İlk defa 1885 yılında Theodor Escherich tarafından izole edilen *E. coli*; *Enterobacteriaceae* ailesinin en önemli üyesidir (Özbaş ve Aytaç, 1995). Boyutları 1.1-1.5 x 2.0-6.0 µm olan ve hareketli özelliklere sahip *E. coli*'ler Gram negatif fakültatif anaerobiktirler. Enterobakteriler selektif ve diferensiyel besiyerleri ile Nutrient agar ve kanlı agarda (MacConkey, EMB agar, vs) 37 °C'de 24 saatte S tipli koloniler şeklinde gözle görülebilir. EMB agarda metalik refle veren koloniler MacConkey agarda ise pembe koloniler oluştururlar. Nutrient bulyonda 24 saatte 37 °C'de bulanıklık meydana getirerek üreyen *E. coli* laktoz, mannitol ve glikoz gibi birçok karbonhidratı asit ve gaz oluşturarak fermente eder (Töreci, 2002).

E. coli'nin optimal üreyebileceği pH 7-7.2 olup optimal üreme ısısı 37 °C'dir. Fakat pH 5-8 arasında 15-44°C'de de üreme özelliği gösterebilir. Özellikle 44°C'de üreyebilmesi benzer bazı bakterilerden ayırt edici özelliğidir. Uzun süreli soğuk ve donmuş muhafaza ortamında canlılığını korur (Töreci, 2002).

E. coli, üriner sistem enfeksiyonları, hemolitik üremik sendrom, pnömoni, sepsis, menenjit, ishal, apse, peritonit, sinüzit gibi enfeksiyonlara neden olabilir (Duman ve ark., 2010). *E. coli*'nin sebep olduğu bu enfeksiyonlar, bağırsaklar ve bağırsak dışında (enterik ve enterik olmayan) oluşmalar şeklinde iki gruba ayrılır. Bağırsaklarda oluşturdukları hastalıkların fizyopatolojilerine göre çeşitli tiplere ayrılmaktadırlar. Bunlar enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroaggregatif *E. coli* (EAEC), diffuz adherent *E. coli* (DAEC), adherent invazif *E. coli* (AIEC)'dir. Bu grupta bulunan *E. coli* suşları sindirim sistemi patolojilerinden sorumludur. Bağırsak dışında oluşturdukları ve sistemik enfeksiyonlara neden olan

bu gruba ise üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjit *E. coli* (NMEC) ve Avian Patojenik *E. coli* (APEC) suşları dahildir (Allocati ve ark., 2013). *Escherichia* cinsinin; *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulnaris*, *E. blattae* ve *E. alberti* olmak üzere 7 türü vardır (Omerovic ve ark., 2017). Ancak *E. coli*; hem insan hem de hayvan sağlığında en sık karşılaşılan bir bakteridir ve üzerinde en çok araştırma yapılan türdür (Edwards ve Fung, 2006). 19. yüzyıldan beri bağırsak kaynaklı patojenlerin indikatörü olarak kullanılıyor olması *E. coli*'nin en önemli özelliğidir. Ayrıca 1980'li yıllardan sonra *E. coli*'nin toksijenik ile patojenik suşlarının bulunduğu ve hatta ölüme neden oldukları belirlenmiştir (Brunner ve ark., 1997).

E. coli'nin hayvanlarda yaptığı hastalıklar şu şekilde sıralanabilir:

1) Evcil hayvanlarda intestinal hastalıklar (kolibasillozisler):

Yeni doğmuş ve genç hayvanların (buzağı, kuzu, domuz, yavrusu, tay, civciv gibi) enfeksiyonları.

2) Evcil hayvanlarda ekstra intestinal hastalıklar:

A) Ürogenital sistem enfeksiyonları

a) Kedi ve köpeklerde *E. coli* 'den ileri gelen sistitis ve piyelonefritis'ler

b) Köpek ve atlarda genital sistem enfeksiyonları

B) Yara enfeksiyonları

C) Akciğer yangıları (pnömoni)

D) Meme bezi enfeksiyonları (mastitisler)

İntrinsik olarak *E. coli* penisilin G'ye karşı direnç göstermektedir (Allocati ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda insan kaynaklı *E. coli* izolatlarında aminoglikozit, β -laktam, florokinolon ve karbapenem direncinin Güney Avrupa'da yaygın olduğu bildirilmiştir (ECDC, 2014). Avrupa'da ülkeler bazında değerlendirildiğinde ise Türkiye ve Kıbrıs'ta sefalosporin, aminoglikozit, florokinolon ve MDR *E. coli* yaygındır (Allocati ve ark., 2013; Cengiz ve ark., 2012). Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için MDR *E. coli* suşlarının yaygınlaşması büyük risk oluşturmaktadır. Çünkü bu enfeksiyonlar için en sık karşılaşılan risk etmeni *E. coli*'dir. Gıda ve hayvan kaynaklı *E. coli* izolatlarında da MDR'a sıklıkla

rastlanmaktadır. Veteriner hekimliğinde antimikrobiyallerin aşırı kullanılmasına bağlı olarak dirençli *E. coli* suşlarının artış göstermesi (Allocati ve ark., 2013), doğrudan kontaminasyona ya da dolaylı olarak kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu insan sağlığı için büyük risk oluşturmaktadır. Özetle; *E. coli* yeryüzünde birçok ekstraintestinal ekosisteme uyum gösterebilir ve antimikrobiyal direnç faktörlerini insan başta olmak üzere gıda ve hayvanlar ile ekosisteme aktarabilir (Ewers, 2012).

2.2. Antimikrobiyaller

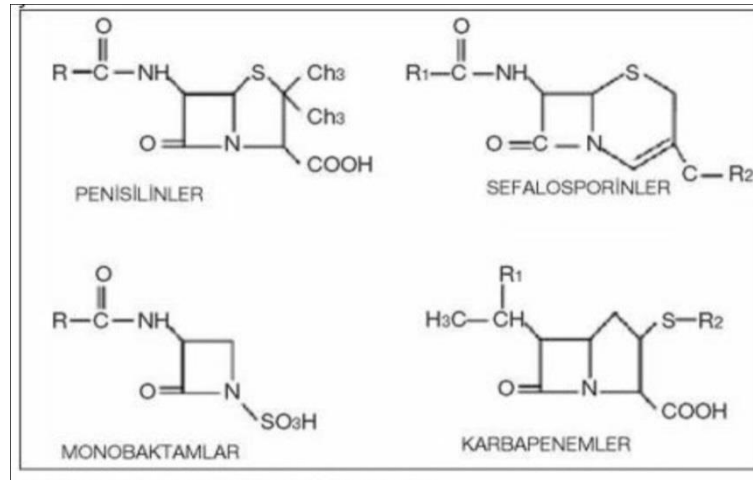
Antimikrobiyallerin ilk keşfi 1929 yılında Alexander Fleming'in penicillium küfü ile agar plağında stafilokokların üremesinin inhibe olduğunu gözlemlemesine dayanır. Antimikrobiyaller; özellikle toprakta bulunan mikroorganizmalar tarafından diğer mikroorganizmaları öldürmek ya da üremelerini durdurmak için üretilen mikrobik hücre metabolizma ürünleridir. *Bacillus* türleri polimiksin ve basitrasineri, *Actinomyces*; aminoglikozidler, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, makrolidler ve rifamisinleri; *Cephalosporium* sefalosporinleri, *Penicillium* ise penisilini üretir (Prescott, 2013)

Bir bakterinin, antimikrobiyal bir ajanın üremeyi durdurucu ya da öldürücü etkisine karşı koyabilme yeteneğine 'direnç' denir. Uygunsuz ve gereksiz antimikrobiyal kullanımı direnç gelişimini artırırken aynı zamanda direnç mekanizmaları sayesinde bakterilerin olumsuz çevre şartlarında canlılıklarını sürdürebilirler (Yüce, 2001). Buna bağlı olarak antimikrobiyal direnci hem hastane gibi sağlık kuruluşlarında hem de toplumda gittikçe önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir. 1900'lü yıllarda sülfonamidlerin keşfi ve penisilin ile diğer antimikrobiyallerin bulunmasından sonra enfeksiyonların birçoğu kontrol altına alınabilmektedir (Wang, 2006). Uygunsuz ve gereksiz antimikrobiyal kullanımının sürdürülmesi her seferinde yeni üretilen bileşiklere karşı farklı mekanizmalar aracılığıyla direnç oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum bilim dünyasında daha az toksik ve daha geniş etki spektrumlu antimikrobiyallerin üretilmesine yönelik çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur (Durupınar, 2001). Bütün dünyada bir

tarafından hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, diğer taraftan üretilen bu ilaçlara karşı direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar yayılım göstermektedir. Dolayısıyla antimikrobiyal direnç sorunu daha önemli bir hale gelmektedir (Şihca ve ark., 2012).

2.3. β -Laktam Antimikrobiyaller

β -laktam grubu antimikrobiyaller; yapılarında bir β -laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini engelleyen geniş spektrumlu etki gösteren ajanlardır. Gerek hastane içinde gerekse hastane dışında enfeksiyonların tedavisinde en sık kullanılan β -laktamlar halka özelliğine göre gruplandırılırlar. Beş gruba ayrılan β -laktam grubu antimikrobiyaller; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve β -laktamaz inhibitörleri şeklinde sınıflandırılırlar (Şekil 1). Temel hedefi penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olan β -laktam antimikrobiyallerinin etkileri yavaştır ve bakterisidal etkilidirler (Bush ve Jacoby, 2010).



Şekil 1: β -laktamların molekül yapısı (Çetinkaya, 2008).

β -laktam antimikrobiyaller; yapısal olarak D-alanil-D-alanin molekülüne benzerler. Bundan dolayı transpeptidasyon işlemini yürüten enzimler bakterinin hücre duvarındaki transpeptidasyonu engellerler. Bu şekilde de murein hidrolaz enzimlerini aktive ederek hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan peptidoglikanların sentezini inhibe ederler. Peptidoglikan zincir N-asetil glikozamin (NAGA) ile N-asetil muramik asit (NAMA)’den oluşmuştur (Öncül, 2002).

β -laktam antimikrobiyaller maksimum etkilerini sadece üreme fazındaki bakterilerde gösterirler ve etkileri minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) dört katında en yüksektir.

2.3.1. Penisilinler

Penisilinler; bir tiazolidin halkasına serbest amino grubu içeren β -laktam halkasının eklendiği 6-amino penisinoleik asit nükleusundan meydana gelirler. Esas yapıya farklı zincirlerin eklenmesi sonucu farmakolojik etkileri ve etki alanlarına göre 6 farklı fonksiyonel gruba ayrılırlar.

Doğal penisilinler (penisilin G, penisilin V): *Penisilium* cinsi elde edilen penisilinlere doğal penisilin denir. Mide asidinde inaktive olan penisilin G yalnızca parenteral yolla kullanılır ve kısa yarılanma ömrüne sahip olduğu için 4-6 saat gibi sık aralıklarla kullanılır. Prokain penisilin G ise, yüksek kan seviyesi gerektirmeyen ancak pnömokok pnömonisi gibi uzun etki süresi istenen durumlarda intramüsküler olarak uygulanır.

Aminopenisilinler: Ampisilin (AMP), amoksisilin (AMX), bakampisilin (BAX) bu grubun üyesidir ve β -laktamaz üreten tüm bakteriler ile *Pseudomonas aeruginosa* 'ya (*P. aeruginosa*) karşı etkisizdirler.

Karboksipenisilinler: Grubun en bilinen üyeleri tikarsilin ve karbenisilin'dir. Günümüzde oldukça yüksek oranda tuz içerdikleri ve yüksek direnç oranlarına sahip oldukları için kullanım dışıdır (Cengiz, 2004).

Asilüreidopenisilinler: Güçlü antipsödomonal etki gösterirler. Azlosilin, piperasilin, mezlosilini içeren bu grup, monosodyum tuzu şeklinde kullanılır (Öncül, 2002).

Penisilinaza dirençli penisilinler: Stafilokokların hemen tamamının salgıladığı penisilinaz enzimine dayanıklı olan tek penisilin grubudur. metisilin, nafsilin, oksasilin, dikloksasilin, kloksasilin bu grubun üyeleridir.(Öncül, 2002).

Beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine penisilinler: Diğer penisilinlere göre daha geniş bakteri spektrumu ile toplumdan kazanılmış enfeksiyonların tedavisinde güvenle kullanılan antimikrobiyallerdir. Amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, tikarsilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktamdan oluşan çeşitli türleri bulunmaktadır. (Öncül, 2002).

2.3.2. Sefalosporinler

Temel yapısı 7-amino-sefalosporanik asit olan sefalosporinler; sefalosporin C'den türeyen β -laktam grubu antimikrobiyalleri oluştururlar (Liarrul ve ark., 2010). Sefalosporinler ilk defa *Cephalosporium acremonium* mantarından izole edilmiştir. Sefalosporinler, bakterisidal etkisini bakteri peptidoglikan sentezini inhibe ederek gösterir. Sefalosporinlerin temel yapısına yan ürünlerin bağlanması sonucunda etki mekanizmaları ile fonksiyonel özellikleri değişiklik göstermektedir. Dolayısı ile sefalosporinler antimikrobiyal etki sınıfına göre 4 kuşak olarak (jenerasyon) incelenmektedir (Yıldız ve ark., 2014).

Birinci kuşak sefalosporinler: Gram pozitif bakterilere etkin olup Gram negatif bakterilere etkinlikleri düşük olan bu grup sefalosporinler içinden en çok bilinen sefaleksil, sefadroksil, sefazolin ve sefalotindir. Sefalotin ilk kullanıma giren sefalosporin olmasına rağmen yan etkileri nedeniyle kullanılmamaktadır.

İkinci kuşak sefalosporinler: Birinci kuşak sefalosporinlere kıyaslı Gram negatif etkinlikleri yüksek olan sefalosporinlerdir. Sefaklor, sefuroksim, sefotetan ve sefoksitin içeren bu grubun Gram negatif bakterilere de etkinlikleri vardır.

Üçüncü kuşak sefalosporinler: 1980'li yıllarda kullanıma giren ve Gram negatif bakterilere yüksek, Gram pozitif bakterilere ise düşük etkinlikleri olan bu grubun üyeleri sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefiksim ve sefdinirindir. Türkiyede ve dünyada en fazla tüketilen üyesi seftriaksondur. Anaerop etkinlikleri düşüktür. *S. aureus*'a etkinlikleri yoktur.

Dördüncü kuşak sefalosporinler: Başta sefepim (SEP) olmak üzere geniş spektruma sahip olan bu grup hem Gram pozitif bakterilere hem de Gram negatif

bakterilere yüksek etkinlikleri vardır. Özellikle üçüncü kuşak sefalosporinlere göre daha güçlü Gram pozitif etkinliğe sahip olmakla birlikte β -laktamazlara dirençlidirler. Sefalosporinlerin en son ve en yeni kuşağı beşinci kuşak sefalosporinlerde seftarolin ve seftobiprole yer almaktadır. Metisiline direçli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (MRSA), psödomonal ve nazokimyasal enfeksiyonların tedavisinde etkilidirler. Bu gruptaki ilaçların bazılarının çocuklarda kullanımı FDA tarafından onaylanmamıştır (Yıldız ve ark., 2014).

2.3.3. Monobaktamlar

Monobaktamlar; monosiklik yapıdaki bir β -laktam halkasından oluşurlar. Monobaktamlar; Gram negatif bakterilerin PBP'e bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Gram negatif bakterilerden özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi ile *Pseudomonas* türlerine karşı daha etkilidirler. Ancak bu grup; anaerob bakteriler ile Gram pozitif bakterilere karşı etkisizdir. Klinik kullanımı olan Aztreonam monobaktamlar içinde ilk sırada yer alır (Li, 2017).

2.3.4. Karbapenemler

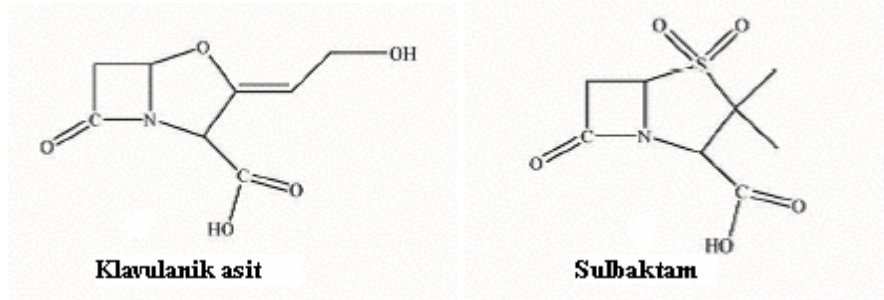
En geniş spektrumlu β -laktam antimikrobiyaller olan karbapenemler yapısal olarak sülfür veya hidrojen atomları yerine hidroksietil yan zinciri barındırmalarından dolayı sefalosporin ve penisilin grubundan ayrılırlar. Sentetik grup β -laktam olan karbapenemler birçok Gram negatif, Gram pozitif, anaerob ve aerob bakteriye karşı etkilidir. Bu grupta imipenem, meropenem, ertapenem bulunmaktadır (Rice ve ark., 2007).

2.3.5. β -Laktamaz İnhibitörleri

β -laktamaz inhibitörleri ilk defa 1990'lı yıllarda keşfedilmiş ve TEM-1 β -laktamaz grubunun bir varyantı olarak sınıflandırılmışlardır. Sonraki yıllarda İnhibitör-Dirençli TEM ('Inhibitor-Resistance TEMs', IRTs) olarak adlandırılmışlardır (Eftkhar, 2005).

Molekül yapıları diğer β -laktam grubu antimikrobiyallere benzer. Bu nedenle β -laktam grubu antimikrobiyaller Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenen inhibitör dirençli β -laktamazlar tarafından inaktive edilebilir. β -laktamaz inhibitörleri β -laktam antimikrobiyallerinin β -laktamazlara duyarlı katalitik bölgesine irreversible olarak bağlanarak bileşiğin hidrolizini engeller. Buna ek olarak β -laktamaz inhibitörleri bakterinin PBP'e bağlanarak antimikrobiyalin daha etkili olmasını sağlar. En bilinen ve sıklıkla kullanılan β -laktamaz inhibitörleri; klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktamdır (Prinakaris ve ark., 1997).

Klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam tam bir β -laktam gibi davrandıkları için partner bir β -laktam ile birlikte kullanılmalıdır. Böylece ana bileşik enzimatik hidrolizden korumuş olur (Şekil 2) (Bedir, 2006).



Şekil 2: β -laktamaz inhibitörlerinin moleküler yapısı (Bedir, 2006)

2.4. β -Laktam Antimikrobiyallere Karşı Direnç Gelişimi ve Direncin Mekanizmaları

PBP; bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanın sentezinden sorumlu bir moleküldür. Bütün β -laktam antimikrobiyalleri bu PBP molekülüne bağlanarak D-

alanil D-alanin transpeptidaz ile transglikosidaz aktivitesini inhibe ederler. Çünkü β -laktam antimikrobiyaller yapısal olarak D-alanil D-alanin peptid'e benzer. İrreversibl olarak gerçekleşen bu bağlanma işlevsiz ve stabil bir asil kompleksi meydana getirir. Hücre duvarındaki transpeptidazların inhibe olması sonucu otolizinler aktifleşir ve hücre duvarı yıkılır. Yüksek osmotik basınçtan dolayı su bakteri hücresinin içine doğru girerek bakterinin ölmesine neden olur (Yoneyama ve Katsumata, 2006).

Bakterileri inaktive etmek amacıyla geliştirilen her antimikrobiyalden belli bir süre sonra tekrar bir direnç mekanizması gelişmekte ve dolayısıyla bakterilerde yeni ve daha güçlü çeşitli direnç mekanizmaları ortaya çıkabilmektedir (Winn ve ark., 2006). Direnç gelişimi bakterinin doğasından kaynaklı olabildiği gibi herhangi bir mutasyon ya da genetik materyal kazanımı sonucunda da olabilir. Esas olarak direnç gelişiminde (1) bağlanma noktalarının modifiye olması, (2) enzim üretimi, (3) membran pompası ve (4) membran geçirgenliğinin azalması gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. Enzimler yoluyla direnç geliştirme bakterilerde en sık karşılaşılan mekanizmaların başında gelmektedir (Tablo 1). Bunun en iyi örneği ise β -laktam grubu antimikrobiyallere karşı β -laktamaz enzimlerinin neden olduğu dirençtir (Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Bakteriler β -laktam antimikrobiyallerine karşı 4 yol ile direnç geliştirirler (Kizirgil 2004).

1. Hücre duvarı kanalların azalması ya da porinlerin daraltılması,
2. Atım pompası aktivitesinin artmasına bağlı olarak antimikrobiyalin hücre dışına pompalanması,
3. PBP'ye bağlanarak yapısal değişiklikler oluşturup antimikrobiyalin bağlanmasının azaltılması ya da engellenmesi,
4. β -laktamaz üretimi.

Tablo 1: Mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç mekanizmaları (Demirtürk ve Demirdal, 2004)

Direnç mekanizması	Etkilendiği antimikrobiyaller
Antimikrobiyalin hedef bölgeye ulaşmasının engellenmesi (içeri girmesini güçleştirerek ya da dışarı atılımın hızlandırarak)	β -laktam antimikrobiyaller, kinolonlar, kloramfenikol, tetrasikilin, eritromisin, trimetoprim
Antimikrobiyalin etkilendiği hedef noktanın değiştirilmesi	β -laktamlar, aminoglikozid, eritromisin, klindamisin, kinolonlar, rifampin, sülfamid, trimetoprim, vankomisin
Antimikrobiyalin sentezlenen bir enzimle inaktive edilmesi	Aminoglikozidler, β -laktamlar, kloramfenikol

2.4.1. β -Laktamazlara Bağlı Direnç

β -laktamlar ile ilişkili ilk direnç *E. coli*'ye karşı ampisilinin kullanılmaya başlamasından sonra gelişmiştir. Bu direncin nedeni plazmid aracılı SHV-1 ile TEM-1 gibi dar spektrumlu β -laktamaz kodlayan genlerdir. 1990'ların başında bakteri seleksiyonundan dolayı direnç sıklığı ve şiddeti artmış bunun üzerine geniş spektrumlu sefalosporinler geliştirilmiştir. Sonraki yıllarda ise GSBL'lerin kullanımı artış göstermiştir. GSBL'ler genellikle plazmid üzerinde yerleşiktir ve bu nedenle kısa sürede mikroorganizmalar arasında yayılım gösterir (Heritage ve Zali, 1999).

Günümüzde 350 farklı β -laktamaz enziminin varlığından bahsedilmektedir. Bildirilen β -laktamazlardan bazıları penisilinlere karşı spesifik etki gösterirken bazıları sefalosporinlere, bazıları ise diğer β -laktam grubu antimikrobiyallere karşı etki gösterir. β -laktamaz sentezi yapan en önemli patojen Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'tur. Gram negatif özelliğindeki β -laktamazlar ise plazmid ya da kromozomun kontrolü altında sentezlenmekte ve periplazmik bölgede depolanmaktadır (Öztürkeri, 1997).

2.4.2. Hedef Moleküllerde Oluşan Değişikliklere Bağlı Direnç

β -laktam antimikrobiyallerinin esas hedefi bakterinin hücre duvarında bulunan PBP olarak bilinen transpeptidaz enziminin aktif bölgesidir (Winn ve ark., 2006). Kromozomal mutasyon sonucu meydana gelen bu direnç PBP sayısının azalması, PBP'nin β -laktam antimikrobiyalına afinitesinin azalması veya β -laktam antimikrobiyallere düşük bağlanma eğilimi gösteren yeni PBP'nin sentezlenmesi yoluyla meydana gelmektedir. PBP'de meydana gelen değişiklikler doğrudan β -laktam grubu antimikrobiyallere karşı direncin gelişmesinden sorumludur (Mazel ve Davies, 1999).

2.4.3. Hücre İçine Girişin Engellenmesi ile Oluşan Direnç

β -laktam molekülleri Gram negatif bakterilerde porları kullanarak periplazmik alana geçerler. Bu direnç mekanizması Gram pozitif bakterilerde etkili değildir. Çünkü Gram pozitif bakterilerin dış zarları yoktur (Sanders ve Sanders, 1992). Antimikrobiyalin etkililiğini göstermesi; porinlerin sayısına, özelliklerine, antimikrobiyalin yüküne, büyüklüğüne ve çözünürlüğüne göre farklılık göstermektedir (Yokoyama ve ark., 1996).

2.4.4. Atım Pompası Aktivasyonu Sonucu Gelişen Direnç

ATP kullanılması ile gerçekleşen bu mekanizma özellikle Gram negatif bakterilerin direnç kazanmalarında daha önemlidir. Çünkü; Gram pozitif bakterilerde tek tabakalı peptidoglikan yapı mevcut iken Gram negatif bakterilerde iç ve dış plazma membranı ile periplazmik aralık bulunmaktadır (Forbes ve ark., 2003).

2.4.5. Çoklu İlaç Direnci (multidrug resistance: MDR)

1900'lü yıllardan önce enfeksiyöz hastalıkların birçoğu tedavi edilebilirken antimikrobiyallerin yanlış kullanılmalarına bağlı olarak antimikrobiyallere karşı bir veya birden fazla direnç mekanizması gelişmiştir. 1900'lü yılların sonuna doğru ise *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) ve enterokoklar gibi hastane enfeksiyonlarından sık izole edilen patojenlerde MDR gösteren suşlar düşük oranda ortaya çıkmaya başlamıştır. İlk zamanlarda sadece hastanelerde ortaya çıkan MDR fenotipi gösteren bu suşlar daha sonra çevreye ve topluma yayılmaya başlamış, sonuç olarak da; bu suşların neden olduğu ve klasik antimikrobiyal tedavilerine cevap vermeyen yeni enfeksiyonlar gelişmiş ve bu durum bütün dünyada yüksek mortalite ve morbiditenin sebebi haline gelmiştir (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

2.5. β -Laktamazlar

İlk defa Dr. Alexander Fleming tarafından keşfedilen β -laktamazlar β -laktam halkasının amid halkasını parçalayan enzimlerdir. Zamanla antimikrobiyal spektrumunun genişlemesine bağlı olarak birçok antimikrobiyal ve bunlarla ilişkili birçok β -laktam enzimi keşfedilmiştir. β -Laktamazların modern tıpta moleküler yapı, substrat profili, hidrolitik etkinlik ve inhibitörlere duyarlılık gibi özellikler açısından tanımlanması yapılmış ve çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır (Fernandez Canigia ve ark., 2015).

Temel olarak β -laktam antimikrobiyallerinin ortak özellikleri ‘beta-laktam’ adı verilen 4 atomlu amid halkası taşıma yapılarıdır. Ortak halkaya her yeni bir yan zincirin bağlanması sonucunda ise farklı β -laktamlar antimikrobiyal elde edilmektedir. β -laktamazlar esas olarak β -laktamların antimikrobiyal direnç mekanizmasında etkili olmaktadır. β -laktamazları kodlayan genler; plazmidlerde, bazı bakterilerin kromozomlarında ya da transpozonlarda bulunurlar. Son yıllarda ‘bla’ olarak adlandırılan β -laktamaz geni integronlar üzerinde tanımlanmıştır (Forbes ve ark., 2003).

β -laktamazlar aktif bölgelerinde ya bir metal iyonu ya da bir serin kökü taşırlar. Bu yapılar; amid halkasına bağlanarak β -laktamazın hidrolize olmasını sağlarlar. Özetle; β -laktamazlar; β -laktam antimikrobiyalını hidrolize ederek antimikrobiyalı penisiline bağlanmadan hemen önce inaktive eden enzim grubudur (Fernandez Canigia ve ark., 2015).

β -laktamazlar arasında en büyük ilgi son yıllarda GSBL’ler üzerine yoğunlaşmıştır. GSBL’lerden sonra ise karbapenemazlar ile inhibitör dirençli β -laktamazlar en önemli β -laktamaz grubunu oluşturmaktadırlar (Murray ve ark., 2009).

Direnç gelişimi gibi sebeplerden dolayı çeşitlenen β -laktamaz enzimlerinin adlandırılması gün geçtikçe kompleks bir hale gelmiştir. Adlandırma tercih ettikleri substrata göre (OXA, FUR, CARB, IMP) yapılabildiği gibi izole edildikleri bakteri suşlarına (PSE, AER), hastaneye (RHH, MIR), genlerine (Cep A, Amp), biyokimyasal özelliklerine (NBC, SHV), eyaletlere (OHIO) ya da hasta isimlerine

(ROB, TEM), göre de yapılabilirler (Tablo 2). Bu adlandırmalardan bazıları geçerliliklerini yitirmişlerdir. Yeni adlandırmalar ise bazen oldukça karmaşık durumların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Örneğin; TEM enzimlerinden türeyen enzimlere CTX (sefotaksimaz), CAZ (seftazidimaz) ya da IRT (inhibitör rezistan) gibi isimler karışıklığa neden olmuşlardır. En son TEM den oluşan bütün enzimlere TEM 43, TEM 26 gibi numaralar verilmiştir (Bush ve Jacoby, 2010) .

Tablo 2: β -laktamazların adlandırılmasına örnekler (Kamburoğlu, 2011).

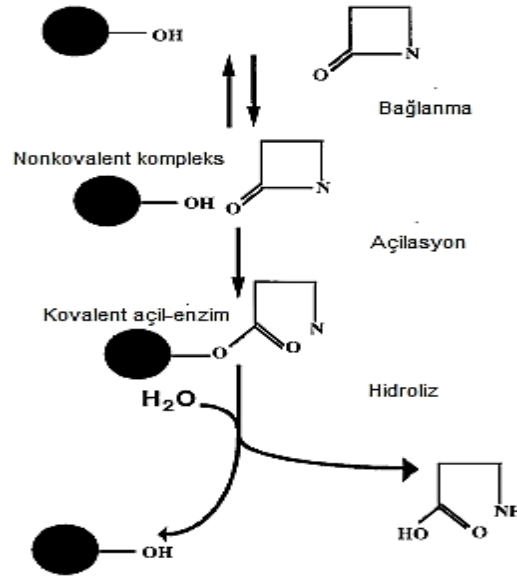
β -laktamaz isimi	Yıl	Varyant sayısı	İsimin orijini
SHV tip	1983	>100	Sulphhydryl variable
TEM tip	1985	>160	Temoneira
CTX-M tip	1989	>65	Cefotaximase –Munich
SFO-1	1988	1	Serratia fonticola
TLA-1	1991	1	Tlahuicas (Hindistan kabilesi)
PER	1991	3	Pseudomonas extended resistance
VEB	1996	5	Vietnam extended-spectrum β lactamase
BES-1	1996	1	Brazilian ESBLs
GES	1998	9	Guyana ESBLs
BEL-1	2005	1	Belgium ESBLs
OXA	1991	En az 9	Oksasilin >Penisilin hidrolizi

2.5.1. β -laktamazların Sınıflandırılması

β -laktamazlar ilk defa Abraham ve Chain (1940) tarafından sınıflandırılmışlardır. β -laktamazlar genetik yapıları başta olmak üzere birçok şekilde sınıflandırılmış ve kategorize edilmişlerdir (Opal, 2000).

β -laktamazları Ambler (1980) nükleotid dizilimler ile amino asit sıralanış şekillerine göre sınıflandırırken, Sykes-Richmond (1973) izoelektrik noktalarına göre, Bush (1989) ise biyokimyasal formasyonlarına göre kategorize etmiştir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucu ise β -laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört temel sınıfa ayrılmıştır. B sınıfı β -laktamazlar çinko iyonuna gereksinim duyarken A, C ve D sınıfı β -laktamazlar serin ester aracılığı ile antimikrobikalleri

hidrolize eden enzimlerdir. Enzim ilk olarak nonkovalent bağ ile antimikrobiyale bağlanır (Şekil 3). Yeni oluşan metabolit nonkovalent bağ 'michaelis'adını alır. Aktif bölgede bulunan serinin üzerindeki serbest hidroksil grubu kovalent ester grubunu oluşturmak için β -laktam halkasına doğru hareket eder. Serinin hidrolize olması ile aktif enzim serbest kalarak antimikrobiyalin etkisizleştirilmesinde rol oynar (Özsoy, 2001).



Şekil 3: β -laktamazların etki mekanizması (Livermore, 1995)

Amblere göre (Bush ve Jacoby, 2010) β -laktamazlar (Tablo 3);

Grup A: Aktif bölgesinde serin aminoasiti taşıyan bu grup yaklaşık 29000 dalton civarında bir molekül ağırlığına sahiptir. Bu grubun en yaygın örnekleri Gram negatif bakterilerde görülen TEM-1 ve SHV tipi enzimlerdir (Pfaller ve Segret, 2006).

Grup B: Penisilin, sefalosporin ve karbapenemleri hidrolize eden β -laktamaz aktivitesinin olması için çinko bağlayıcı tiol grubuna sahip ve klavulanik asit ile inhibe olmayan enzimlerdir (Bradford, 2001).

Grup C: Gram negatif bakterilerde ve *E. coli* K12'nin kromozomal ampC geni üzerinde bulunan, sadece sefalosporinleri parçalayan ve yaklaşık 39000 dalton molekül ağırlığındaki enzimlerdir. Bu gruptaki enzimler dirençli oldukları için klavulanik asit ile inhibe olmazlar (Gülay, 1999).

Grup D: Klavulanik asit ile inhibe olan ve oksasilini hidrolize eden enzimlerdir (Gür, 1996).

Tablo 3: Ambler'e göre β -laktamaz sınıflandırması ve bulunduğu organizmalar (Bush ve Jacoby, 2010)

Ambler'in genetik sınıflaması	Grup	Enzim Tipleri	Hidroliz spektrum Özellikleri	Organizma	Yerleşim
A	2b	Dar spektrumlu β -laktamazlar TEM-1, TEM-2, SHV-1	Amino ve karboksipenisilinler Klavulanat duyarlı	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i> (+)	Plazmid ve Kromozomal aracılı
A	2be	Geniş spektrumlu β -laktamazlar TEM-3, TEM-29, TEM-42, SHV-2, SHV-12	Geniş spektrumlu β -laktamlar Klavulanat duyarlı	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>K.pneumoniae</i> (++) <i>P.aeruginosa</i> (+)	Plazmid aracılı
A	2br	İnhibitör dirençli β -laktamazlar TEM-30, TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51	Amino ve karboksipenisilinler Klavulanat dirençli	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i> (++)	Plazmid aracılı
A	-	İnhibitör dirençli ve geniş spektrumlu β -laktamazlar SHV-10, TEM-33, TEM-15	Geniş spektrumlu β -laktamlar Klavulanat dirençli	<i>E. coli</i>	Plazmid aracılı
A	-	Karbapenemazlar NmcA, Sme-1, IMI-1	Karbapenemler ve aztreonam Klavulanat duyarlı	<i>E. cloaca</i> <i>S.mercenscens</i>	Kromozomal
B	3	Karbapenemazlar IMP-1	Geniş spektrumlu β -laktamlar, karbapenemler Klavulanat dirençli	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>	Plazmid ve Kromozomal aracılı
D	2d	OXA-11, OXA-21	Penisilinler, kloaksasilin, Klavulanat dirençli	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>	Plazmid aracılı
C	1	Plazmid aracılı sefalosporinazlar MIR-1, MOX-1, CMY-1, CMY-5 FOX-1, LAT-1	Sefamisinler, oksiminocefalosporinler ve aztreonam Klavulanat dirençli (MOX-1 hariç)	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>K.pneumoniae</i> (++)	Plazmid aracılı

Amblerden sonra β -laktamazları sınıflandıran bir diğer bilim adamı ise Bush Medeiros Jacoby'dir (Bush ve Jacoby, 2010) Bu sınıflandırma fonksiyonel özellikleri, klavulanik asit inhibisyonu ve substrat profili baz alınarak yapılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: Karşılaştırmalı olarak β -laktamazlar (Gür, 1996)

Fonksiyonel Grup*	Moleküler Sınıf**	Öncelikli Substrat	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Kromozomal ve plazmid kökenli AmpC tipi enzimler (CMY-3b, Smar, Fox-1-5, LAT-1-4 vb)
2a	A	Penisilinler	Gram (+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Dar spektrumlu Sefalosporinler	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, sefamisinler hariç sefalosporinler, monobaktamlar	TEM ve SHV türleri GSBL'ler (TEM-1-160, SHV-1-100) PER-1-2, VEB-1-3, CTX-M-1-54, GES-1-9
2br	A	Penisilinler	IRT 1-28, SHV-10 ve 26, TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisin	PSE-1, PSE-3-4, SAR-1
2d	D	Oksasilin, Penisilinler	OXA tipi enzimler (OXA-1-82)
2e	A	Sefalosporinler	<i>Proteus Vulgaris</i> 'in indüklenebilir β -laktamazı
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, Karbapenemler, monobaktamlar	<i>E. cloacae</i> 'nin NMC-A ve IMI-1'i ve <i>S. marcescens</i> 'in Sme-1-2 enzimleri
3	B	Karbapenemler dahil birçok β -laktam (monobaktamlar hariç)	Değişik türlerce üretilen IMP-1-23, VIM-1-14
4	?	Penisilinler	<i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı

*Bush-Medeiros-Jacoby sınıflandırmasına göre

** Ambler sınıflandırmasına göre

Grup 1 β -laktamazlar: Sefalosporin grubundan olan bu enzimler klavulanik asitle inhibe olmazlar. Bu grupta yer alan β -laktamazlar genellikle indüklenebilirler ve yüksek oranda mutant enzim üretirler. Klavulanik asit ile sulbaktamdan etkilenmezler ve sefalotin ile sefaloridini penisilinlerden daha hızlı hidrolize eder. Ambler'in C sınıfı β -laktamazlarına uyarlar ve kloksasilin ile aztreonam tarafından inhibe edilirler. 7'den büyük izoelektrik noktalara sahiptirler (Gür, 1996).

Grup 2a β -laktamazlar: *S. aureus* enzimlerini içeren bu grup; klavulanik asite karşı duyarlıdır ve penisilini inhibe eder.

Grup 2b β -laktamazlar: Penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize ederler ve klavulanik asitle inhibe olurlar. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi plazmid kontrolündeki enzimler bu grupta yer alır. Bu gruptaki β -laktamazlar iminepem, aztreonam ve sefalosporinlere karşı çok az hidrolitik aktivite gösterir (Gür, 1996).

Grup 2be β -laktamazlar: Seftazidim, sefotaksim ve aztreonam gibi oksiamino β -laktamları hidrolize eden GSBL'lerdir. İlk olarak Türk izolatlarından izole elde

edilen PER-1 bu grupta yer almaktadır ve klavulanik asitle güçlü bir şekilde inhibe olurlar (Gür, 1996).

Grup 2br β -laktamazlar: Klavulanik asite karşı yüksek direnç gösteren GSBL'lerdir (Gür, 1996).

Grup 2c β -laktamazlar: Ambler'in A sınıfına giren bu grup; aztreonam ve kloksasiline karşı düşük bağlanma özelliği gösterir ve genellikle klavulanik asitle inhibe olur (Gür, 1996).

Grup 2d β -laktamazlar: Klavulanik asit ile sulbaktama dirençli olan bu gruptaki β -laktamazlar kloksasilini çok hızlı bir şekilde hidroliz ederler. Türkiye'de izole edilen ilk suş olan OXA enzimleri (OXA14'den OXA 22'ye kadar) bu gruptadır. OXA 11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suшта tanımlanmıştır (Bedir, 2006).

Grup 2e β -laktamazlar: Bu grup sefalosporinazları içerir. *Proteus vulgaris*'in indüklenebilir β -laktamazlarıdır (Gür, 1996).

Grup 2f β -laktamazlar: Klavulanik asit ile inhibe olurlar ve karbapenemleri hidroliz ederler.

Grup 3 β -laktamazlar: Enzimatik reaksiyon göstermeleri için metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Ambler'in B sınıfına uyarlar ve klavulanik asit ile inhibe olmayan ancak EDTA ile inhibe olan enzimleri içerir (Gür, 1996).

Grup 4 β -laktamazlar: Birçok penisilinaz grubunu içerirler. Ancak moleküler sınıfları henüz belirtilmemiştir (Bedir, 2006).

2.6. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar (GSBL)

1980'li yıllara kadar Gram negatif bakterilerde antimikrobiyalleri hidrolize edecek herhangi bir plazmid aracılığı β -laktamaz tespit edilememiştir. Ancak birkaç yıl sonra *K. pneumoniae* suşunda sefotaksim ve seftazidimi hidrolize eden ilk GSBL'ler tanımlanmıştır ve sonradan bu grubun SHV-1'in mutanlığı olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda ise SHV-2 ile TEM-2 grupları belirlenmiştir.

Son 20 yıl içinde bütün dünyada yaygın bir şekilde GSBL enzimleri görülmeye başlanmıştır (Pitout ve ark., 2005).

Dünya genelindeki *E. coli* ve *K. pneumoniae* salgınlarının esas nedeni 3. kuşak sefalosporinlerin üretiminden çok kısa bir süre sonra çıkan GSBL'dir. Yapılan kohort çalışmalarda seftazidin ve sefotaksim gibi ajanların aşırı miktarlarda tüketilmelerinin GSBL'lerin ortaya çıkmasına zemin hazırladığı bildirilmiştir. GSBL'ler ilk tanımlandıklarında aslında SHV ve TEM'in bir varyantı olarak bildirilmişlerdir. Ancak sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda CTX-M gibi Batı Avrupa'da, PER-1 varyantı olarak ise Türkiye'de görülebildikleri tespit edilmiştir (Llanes ve ark., 2003).

GSBL'ler sadece enterik çomaklarda değil zamanla *acinobacter* ve *pseudomonas* gibi nonfermente gibi gruplarda gözlenmektedirler. Ayrıca bazı bakteriler tarafından üretilen özel GSBL'ler de tanımlanmıştır (Yılmaz ve ark., 2008).

GSBL'ler hakkında birçok epidemiyolojik araştırma yapılmış ve hangi formlarının hangi coğrafyalarda daha fazla görüldükleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Amerika, Japonya ve Çin başta olmak üzere Kuzey Afrika, İngiltere, İspanya, Portekiz ve Yunanistan'da pekçok farklı GSBL mutantına rastlanmaktadır. Almanya'da SHV-2 ve SVH-5, Fransa'da SHV-4, SHV-3 ve TEM-3, Yunanistan'da ise SHV-5 formları yaygın olarak bulunmaktadır. Uluslararası anlamda Türkiye'de dahil olmak üzere en yaygın bulunan tip SHV-2 dir (Ayaz, 2008).

Son yıllarda dünyada GSBL'lerin yaygınlığı endişe verici bir şekilde artmıştır. Dolayısı ile bu durum insan sağlığını oldukça olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Örneğin *K.pneumoniae* suşları hastanın cildine tutunarak uzun süre yaşayabilmekte ve bu da GSBL enzimlerine karşı neden temkinli olunması gerektiğini ortaya koymaktadır. Aktarımın en önemli yolunun plazmidler aracılığı ile olması da hızlı yayılımın başlıca nedenini oluşturmaktadır (Önnberg ve ark., 2011).

2.6.1. GSBL tipleri

GSBL enzimleri 6 ana başlık altında incelenmiştir:

- TEM ve SHV kökenli olanlar
- TEM ve SHV kökenli olmayanlar
- İnhibitör dirençli β -laktamazlar
- İnhibitör dirençli ve geniş spektrumlu β -laktamazlar
- Karbapenemazlar
- Plazmid aracılı sefalosporinazlar (sefamisinazlar) (Shaikh ve ark., 2015).

2.6.1.1. TEM grubu enzimler

TEM grubu en sık Gram negatif bakterilerde görülmektedir. Örneğin *E. coli*'de görülen ampisilin direncinin yaklaşık %90'ı TEM-1 üretiminden kaynaklanmaktadır. TEM-1 enzimleri dar spektrumlu sefalosporinler ile penisilinleri hidrolize ederler. TEM-1'in ilk türevi kendisinden sadece bir aminoasit farklı olan TEM-2 iken GSBL fenotipi gösteren ilk mutanıtı ise TEM-3'tür. GSBL özelliği gösteren TEM'ler Ser164His-Glu104Lys veya Glu240Lys-Gly238Ser aminoasit değişimi gösterirler (Ayaz, 2008).

TEM tipi β -laktamazlar en sık *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de bulunurken *Enterobacteriaceae* ailesinden *E. aerogenes*, *Morgenella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* ve *Salmonella* spp.'de yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak bunların dışında yine Gram negatif bakterilerden olan *P. aeruginosa* suşunda TEM-42, *Capnocytophaga ochracea* suşunda ise TEM -17 tespit edilmiştir (Bano ve ark, 2009).

2.6.1.2. SHV gurubu enzimler

K. pneumoniae'da en sık bulunan GSBL tipidir. Plazmid aracılıklı ampisilin direncinden %20 oranında sorumludur. İlk SHV'ler 1983 yılında keşfedilmiş ve SHV-2 olarak adlandırılmıştır (Shaikh ve ark., 2015).

Sülfidril Hiper Variabil grubu enzimle sülfidril grubun aktif bölgesine göre tanımlanırlar. Bu tür enzimler tigesiklin, ampisilin ve piperasilin gibi geniş spektrumlu penilisinlere karşı direnç gösterirken, oksinomino-sefalosporinlere karşı herhangi bir etkiye sahip değildirler. Son yapılan çalışmalarda 60'dan fazla SHV tipi tanımlanmıştır (Thenmozhi ve ark., 2014).

2.6.1.3. CTX-M gurubu enzimler

CTX-M tipi enzimler; SHV ve TEM GSBL'lerin aksine, aminoasit dizilimlerindeki farklılıklaşma sonucu değil, enzimin beta ucu ile omega halkasındaki formasyonel değişiklik sonucu ortaya çıkmışlardır. Ayrıca *Kluyvera* sp.de ki β -laktamazların gen transferleri ile ortaya çıkmışlardır (Pitout ve ark., 2004). CTX-M grubu enzimler substrat olarak özellikle sefotaksimi tercih ederler. Ayrıca sefalosporinleri hidroliz etme özelliklerine sahip olan bu enzimler tazobaktama karşı inhibitör etki gösterir. CTX-M gurubu enzimler *E. coli* ve *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) başta olmak üzere bazı enterik Gram negatif bakterilerde de tespit edilmiştir (Shaikh ve ark., 2015).

CTX-M gurubu enzimler özellikle 2000'li yılların başından itibaren konuşulmaya başlanmıştır ve sonrasında filogenetik olarak 5 sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar, CTX-M Grup 1, CTX-M Grup 2, CTX-M Grup 8, CTX-M Grup 9 ve CTX-M Grup 25'dir (Woodford ve ark., 2006). Son yapılan çalışmalarda yaklaşık 150 CTX-M tipi tespit edilmiştir (Jacoby ve Bush., 2014).

2.6.1.4. OXA Grubu

Oksasilin-hidrolizasyon yapabilmelerinden dolayı (yüksek afinite gösterme) bu grup OXA tipi β -laktamazlar olarak sınıflandırılmıştır. Ancak bu grup aslında GSBL olarak kabul edilmez ve geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edemez. Bu kuralı bozan sadece birkaç grup OXA tipi bulunmaktadır (Danel ve ark., 1995). Bunlar; OXA-10 ve OXA-13'ten OXA-19'a kadar olan suşlardır. OXA grubunda hem GSBL özelliği gösteren ve hem de göstermeyen karbapenemaz enzimler (OXA-48) bulunur. Yapılan çalışmalarda OXA'ların aslında SHV ve TEM tiplerinde geliştikleri düşünülmektedir. Bu grubun üyeleri 3. ve 4. kuşak sefalosporinleri inaktive ederler (Bradford, 2001).

OXA grubu, Ambler sınıflandırmasında D grubuna karşılık gelmektedir. İlk keşfedilen OXA ise OXA-11'dir ve Türkiye'de ki bir hastanede yatan hastadan elde edilen *Pseudomonas* suşunda bulunmuştur (Karakoç, 2004).

2.6.1.5. İnhibitörlere Dirençli β -Laktamazlar

İlk gelişen direnç klavulanik asit ile amoksisiline karşı *E. coli*'de bildirilmiştir. Bu β -laktamazlar aslında sefalosporinleri hidrolize edemezler ancak SHV ev TEM'den köken aldıkları için birlikte değerlendirilirler (Aksöz, 2009).

İnhibitör dirençli β -laktamazlardan ilk keşfedilenler klavulanik asite karşı direnç gösteren TEM, β -laktamaz inhibitörlerine direnç gösteren TR-I VE IRT-1'dir. IRT enzimleri Bush–Jacoby sınıflandırılmasında grup 2br'de bulunurlar (Bradford, 2001).

2.6.1.6. Diğer GSBL'ler

Son yıllarda GSBL enzimlerinden ve TEM, SHV, OXA veya CTX-M β -laktamazlarından köken almayan farklı tipler keşfedilmeye başlanmıştır (Kizirgil ve

ark., 2004). PER-1 ilk defa Türkiye’de belirlenmiştir. Sonraki yıllarda *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ve *A. baumannii* de tespit edilmiştir (Thenmozhi ve ark., 2014). VEB-1 enzimi Vietnam’da tespit edilmiştir. *E. coli* ile *P. aeruginosa* suşundan elde edilmiştir (Thenmozhi ve ark., 2014). PER-1 ve VEB-1 dışında PER-2, CME-1, TLA-1, BES-1, SFO-1 gibi enzimler de çeşitli suşlarda izole edilmiştir (Karakoç, 2004).

2.7. Antimikrobiyal Direncin İzlenmesi

β -laktamazların tespiti için durumu ile kullanılacak uygun antimikrobiyal seçiminin yapılması son derece önemlidir. β -laktamazların tespit edilebilmesi için günümüzde birçok yöntem kullanılmaktadır (Tablo 5). β -laktamaz belirleme yöntemleri şu şekilde sınıflandırılabilir (Akova, 2004).

Tablo 5: GSBL saptama yöntemleri (Göker, 2007)

Yöntem tipi	Test adı	Avantaj	Dezavantaj
Fenotipik (rutin)	Standart NCCLS yorum kriterileri	Kolaylıkla ve her laboratuvarda uygulanabilir	ESBL her zaman ‘direnç’ kategorisinde değildir
	NCCLS doğrulama testleri	Uygulama ve yorum kolaydır	Duyarlılık oksiminosefalosporin seçimine göre değişir
	Çift disk sinerji	Uygulama ve yorum kolaydır	Disklerin yerleştirildiği uzaklık standart değildir
	Üç boyutlu test	Duyarlı, yorumu kolay	GSBL'lere özgül değil, emek yoğun
	E-test GSBL stripleri	Uygulaması kolay	Yorum her zaman kolay değildir. ÇDS kadar duyarlı değil, çok pahalı
	Vitek GSBL	Uygulaması kolay	Duyarlılık düşük veri tabanına bağlı
Genotipik (moleküler)	DNA problemleri	Gen ailesine özgül (örn. TEM veya SHV)	Emek yoğun, GSBL-dar spektrumlu ayrımı yapamaz TEM ve SHV türevleri ayrılmaz
	PCR	Uygulaması kolay, Gen ailesine özgül	GSBL-dar spektrumlu ayrımı yapılamaz. TEM ve SHV türevleri ayrılmaz
	Oligotiplendirme	Özgül TEM varyantları saptanır	Özgül oligonükleotid problemleri gerekir, emek yoğunudur, yeni varyantlar saptanamaz
	PCR-RFLP	Uygulaması kolaylığı, spesifik nükleotid değişimleri saptanır	Nükleotid değişimlerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gereklidir
	PCR-SSCP	Bazı SHV varyantlarını ayırmada kullanılır	Özel elektroforez koşulları gerekir
	LCR	Bazı SHV varyantlarını ayırmada kullanılır	Çok sayıda oligonükleotit öncül gerektirir
	Nükleotid dizi analizi	Altın standart, yeni enzimler saptanır	Teknik olarak özel cihaz gerektirir

2.7.1. Fenotipik Yöntemler

GSBL varlığını belirlemek için özellikle *Enterobacteriaceae* bakterileri kullanılmaktadır. Direnç fenotipini belirlemek için kullanılan yöntemler çeşitli gruplara ayrılır. Örneğin disk difüzyon yöntemi seftazidim, seftriakson, aztreonam, Sefotaksim veya sefpodoksime karşı duyarlılığı belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Delialioğlu ve ark., 2010).

2.7.1.1. Disk Difüzyon

Kirby-Bauer tarafından geliştirilen ve laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan en eski antimikrobiyal duyarlılık testlerinden biridir. Bu testin ana amacı, kağıt disklerle emdirilen antimikrobiyalın, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besi yerine difüze olmasına dayanan bir testdir. Bu yöntemde bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanır, Mueller-hinton agar (MHA) plakalarının tüm yüzeyine yayılır ve antimikrobiyal diskleri yerleştirilir. 35±1 °C’de 16-20 saat inkübasyondan sonra disklerin etrafındaki zon çapları ölçülür ve antimikrobiyal duyarlılık sınır tablolarına göre değerlendirmeler yapılır (Luzzaro ve ark., 2006).

2.7.1.2. Gradient Difüzyon (E-test)

Son yıllarda geliştirilmiş olan gradient difüzyon yöntemi, disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir arada uygulanması esasına dayanır. E testi® (bioMerieux AB BIODISK), gradient difüzyon yönteminin ticari bir versiyonudur. Gittikçe artan konsantrasyonlarda antimikrobiyal içeren inert plastik şeritler (stripler) kullanılır. Plastik şeritlerin bir yüzünde antimikrobiyal ilaç içerikleri, diğer yüzeyinde rakamlar bulunur. Disk diffüzyon testinde olduğu gibi besiyerine bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra E-test şeritleri radyal olarak besiyerine yerleştirilir. Anaerop ortamda 35 °C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılır ve bu süre sonunda şerit etrafında inhibisyon zonu oluşur. Elips şeklindeki inhibisyon zonu ile şeritin kesiştiği nokta MİK değerini verir (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

2.7.1.3. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyonu yöntemi yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir. Bu yöntemde kullanılacak antimikrobiyallerin 1:2 oranında azalan seri dilüsyonları hazırlanır. Antimikrobiyal ilaç serisinden 1 ml alınarak 20 ml MHA içeren petrilere

konulur. 0.5 McFarland'a eşit bulanıklığa ayarlanan bakteri kültürü agar plakalara ekilir ve 35-37 °C'de 18 saat inkübe edildikten sonra gözle görülebilir, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirilir (Jenkins ve Schuetz, 2012).

2.7.1.4. Broth Mikrodilüsyon

Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin belirlenmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Broth mikrodilüsyon yönteminin temel amacı antimikrobiyallerin seri dilüsyonları hazırlanarak *in vitro* koşullarda antimikrobiyallerin duyarlılık profillerinin belirlenmesidir. Bu yöntemde Mueller-Hinton Broth'a (MHB) inoküle edilmiş ve 35-37 °C'de 16-20 saat inkübasyonu yapılmış bakteri kültürleri kullanılır. Membran filtrasyonu ile sterilize edilmiş 1 mg/ml veya daha fazla olacak şekilde, stok ilaç solüsyonu, MHB kullanarak 1:2 oranda azalan seri dilüsyonları hazırlanır. Antimikrobiyal solüsyonlar ve 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanan bakteri süspansiyonu eşit miktarda mikropalakalara dağıtılır. 35-37 °C'de 16-20 saat inkübasyondan sonra, bakteri üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenir (CLSI, 2012).

2.7.2. Moleküler Yöntemler

Direnç gelişimi antimikrobiyallerin yanlış kullanılması sonucu oldukça yaygın bir hale gelmiştir ve buna bağlı olarak birçok hastalığın tedavisi oldukça güçleştirmiştir (Durmaz, 2003). Antimikrobiyal direncin yayılması ve gelişiminin önlenmesindeki kritik nokta direncin hızlı bir şekilde doğru olarak tanımlanmasıdır. GSBL'nin varlığı fenotipik testlerle belirlerken, GSBL tipinin karakterize edilmesinde moleküler yöntemler kullanılır. Moleküler karakterizasyon için PCR, PCR-REA, PCR-SSCP ve klonlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (Peterson, 2005).

2.7.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

GSBL'den şüphe duyulan suşlarda PCR tepkimesi ile GSBL genleri araştırılmaktadır. Bu yöntem ile hem GSBL üretimi saptanır hem de enzim genotipi belirlenir. Ancak bu yöntemin maliyeti yüksektir ve teknik deneyim gerektirmektedir (Öncül, 2002).

2.7.2.2. PCR-RFLP (PCR Restriction fragment length polymorphism)

Sadece GSBL fenotipini ortaya koyan bu yöntemde PCR ürünleri restriksiyon endonükleazlarla kesilir ve elektroforezle kesim ürünlerinin ayrımı yapılır. Belirlenen noktalarda mutasyon varlığı tespit edilir (Bali, 2007).

2.7.2.3. Nükleotid Dizi Analizi (DNA sequencing)

GSBL tanımlamasında altın standart klonlama ve dizi analizidir. Nükleotid dizi analizi ile mutasyonlar ve farklı enzim tipleri saptanabilir. Elde edilen GSBL'nin tipi ve enzim olup olmadığı tespit edilir (Rasheed ve ark., 1997).

2.7.2.4. PCR-SSCP (PCR-Single-Strand conformational polymorphism analysis)

Alt tiplerin saptanabildiği bu yöntemde tek zincirde konformasyon polimorfizmi ve özgül yerleşimdeki tek baz mutasyonlarını saptar (Jasser, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada kullanılan *E. coli* İzolatları

Tez çalışması, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında bulunan, sağlıklı ve enfeksiyon bulgusu gösteren sığır, keçi, koyun, köpek ve kedilerden rektal swab yöntemiyle izole edilmiş 112 adet *E. coli* izolatı, *E. coli* kültür koleksiyonundan seçilerek çalışmaya dahil edildi. Seçilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direnç profillerini belirlemek amacı ile fenotipik tarama ve doğrulama testleri, broth mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile yapıldı. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşu olarak seçildi. *E. coli* izolatlarından CAZ ve CTX için hem dirençli hem de duyarlı olan izolatların GSBL genotipinin belirlenmesi için moleküler çalışmalar yapıldı. GSBL geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı. Deneyler kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 6: Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Adı	Modeli	Kullanım amacı
Thermal Cycler	TECHNE TC-3000	PCR Amplifikasyonu
Elektroforez	CLEAVER MULTISUB CHOICE	PCR Jel Görüntüleme
Elektroforez Güç Kaynağı	WWR 300V	PCR Jel Görüntüleme
Jel Görüntüleme Sistemi	UVITEC CAMBRIDGE	PCR Jel Görüntüleme
Mini Santrifüj	CLEAVER CSL omniSPIN	PCR Ürün Boyama
Mikrodalga Fırın	VESTEL MW17	Agaroz Jel Hazırlama
Mikro Plaka Okuyucu	BIO-RAD iMark	MİK'in belirlenmesi
Hassas Terazi	SARTORIUS BA210S	Antibakteriyal Tartımı
Çoklu Pipetleyici	EPPENDORF Research pro	MİK'in belirlenmesi
Multi Vorteks	VELP CLASSIC	DNA İzolasyonu
Mikro Santrifüj	WWR GALAXY 16 DH	DNA İzolasyonu
Kuru Blok Isıtıcı	LABNET ACCUBLOCK	DNA İzolasyonu
Dansitometre	BIOSAN DEN-1B	Bakteri kültürü standardizasyonu
Soğutmalı İnkübatör	NÜVE ES120	Kültür İnkübasyonu
İnkübatör	NÜVE EN055	Kültür İnkübasyonu
Orbital Karıştırıcı	BIOSAN OS-10	Bakteri İzolasyonu
Laminar Hava Kabini	ESCO Class II BSC	Fenotipik ve Moleküler Çalışmaları
Pipet Seti	THERMO FINPIPETTE F1	Fenotipik ve Moleküler Çalışmaları
Ultra Saf Su Sistemi	ELGA	Fenotipik ve Moleküler Çalışmaları
Otoklav	NÜVE OT 40L	Sterilizasyon
Soğutucu	BOSCH	Besi Yeri ve Reaktiflerin Saklanması
Derin Dondurucu (x 2)	BOSCH	Bakteri, Reaktif, DNA İzolatlarının Saklanması

3.2. Fenotipik Yöntemler

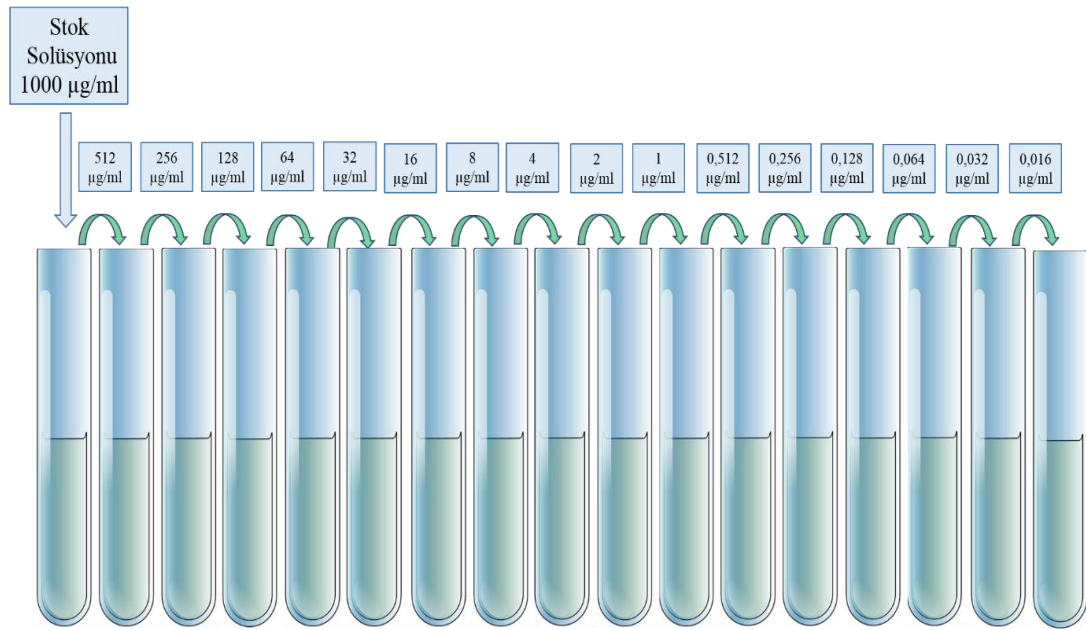
3.2.1. Disk Difüzyon

Disk Difüzyon yöntemi CLSI'in (Clinical and Laboratory Standarts Institute) önerdiği kriterlere göre yapıldı. Bunun için, inkübatörde bir gece öncesinden 37 °C'de MHB sıvı besiyerinde üretilen *E. coli* izolatlarının 0.5 McFarland bulanıklık standardı yoğunluğunda süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan alınan örneklerin MHA plaklarına ekimi yapıldı ve üzerlerine yine CLSI'nın önerdiği hacimlerde CAZ (30µg) ve CTX (30µg) içeren antimikrobiyal diskleri ile Seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg, CAZ/CLA) ve Sefotaksim/klavulanik asit (30/10 µg, CTX/CLA) içeren antimikrobiyal diskleri steril bir pens yardımıyla yerleştirildi. Diskleri yerleştirdikten sonra 15 dakika içerisinde plaklar ters çevrilerek 35±1°C'de 16-20 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilmiş antimikrobiyal disklerinin çevresinde oluşan zonlar cetvel ile ölçülerek zon çapları CLSI kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi. GSBL varlığının belirlenmesi CLSI'nın önerilerine uygun olarak disk difüzyon testinde izolatların inhibisyon zon çaplarının seftazidim (CAZ) için ≤ 22 mm ve sefotaksim (CTX) için ≤ 27 mm olduğu durumlarda yapıldı. Bir bakterinin GSBL pozitif olarak nitelenebilmesi için ön kriterlere uygun olmak koşuluyla ilacın bireysel zon çapı ile klavulanik asit kombinasyonu zon çapı arasındaki farkın ≤ 5 mm olması gerekir (CLSI, 2016).

3.2.2. Broth Mikrodilüsyon

Broth mikrodilüsyon testi, CLSI'in önerileri doğrultusunda MHB sıvı besiyeri kullanılarak uygulandı. Bakteri kültürü, MHB sıvı besiyerine *E. coli* izolatlarının 37 °C'de 16-20 saat inkübasyonu yapılarak hazırlandı. Stok solüsyonu hazırlamak için ise toz haldeki antimikrobiyaller 10:90 metanol/PBS'de (Phosphate Buffered Saline: PBS) çözündürüldü. Hazırlanmış olan stok solüsyonlar 0,20 µm çapındaki filtreden geçirilerek sterilize edildi. Stok solüsyondan her antimikrobiyal için 0,016-512 µg/ml

aralığında seri dilüsyonları hazırlandı (Şekil 1). Son konsantrasyonlar 0,008-256 µg/ml aralığında olacak şekilde 50 µl antimikrobiyal seri dilüsyonları ve 50 µl 0.5 McFarland bulanıklık standardı yoğunluğunda hazırlanmış bakteri kültürleri steril mikrolakalara dağıtıldı. 37 °C’de 16-20 saat inkübasyona bırakılarak ardından mikrolaka okuyucu sistem yardımıyla (Bio-Rad, iMark) 595 nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçülerek üremenin olmadığı konsantrasyon MİK olarak değerlendirildi (CLSI 2016).



Şekil 4. Broth-mikrodilüsyon testlerinde kullanılan seri dilüsyon (Şahintürk, 2018)

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1. Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu

MHA’da 37 °C’de 18-24 saat inkübasyonu yapılan bakteriler öze yardımıyla toplanandı ve mikrosantrifüj tüpünde nükleaz içermediği bilinen 0,2 ml steril distile su içinde çözdürülerek homojenize edildi. Hazırlanmış olan bakteri homojenatı kuru blok ısıtıcıda (LABNET ACCUBLOCK) 99°C’de 5dk kaynatılarak, 1 dk buz üzerinde bekletildi. 13000 rpm’de 45 sn santrifüj yapıldıktan sonra homojenatın üstte

kalan ve DNA içeren süpernatant kısmı, bakterilerin epidemiyolojik kökenini belirlemek için PCR amplifikasyonunda kullanıldı.

3.3.2. PCR Amplifikasyonu

3.3.2.1. *bla_{SHV}* Geninin PCR Amplifikasyonu

E. coli'de β -laktamaz direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi amacıyla *bla_{SHV}* geni, Lim ve arkadaşları (2009) tarafından tanımlanan yöntemlere göre amplifiye edildi. Hedef bölgelerin PCR-amplifikasyonu için Tablo 7'de verilmiş primer çiftleri kullanılmıştır. *bla_{SHV}* genin amplifikasyonu için PCR karışımı toplam hacmi 50 μ l olacak şekilde, 1 μ l düz primer (F) ve 1 μ l ters primer (R), 12,5 μ l 2xPCR Master miks (OneTag), 2 μ l DNA izolatu ve 21 μ l ultra saf distile su kullanılarak hazırlandı. *bla_{SHV}* geninin PCR amplifikasyonunda kullanılan termal program Tablo 8'da gösterilmiştir.

Tablo 7: Hedef gen bölgelerine ait oligonükleotidler

Primer	Dizi	Gen	Büyükölük (bp)	Kaynak
<i>bla_{SHV}</i> F	GGTTATGCGTTATATTCGCC	<i>bla_{SHV}</i>	867	Lim, 2009
<i>bla_{SHV}</i> R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			

Tablo 8: *bla_{SHV}* için termal program

Termal Siklus Programı (<i>bla_{SHV}</i>)			
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
İlk Denatürasyon	96	5 dk	1
Denatürasyon	96	1 dk	34
Primer Bağlanması	5	1 dk	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1
Soğutma	4	Süresiz	

3.3.3. Jel Elektroforez ve Görüntüleme

3.3.3.1. Agaroz Jel Hazırlama

Kaynatma yöntemi ile izolasyonu yapılmış olan DNA örneklerinin, PCR amplifikasyon sonucu elde edilen amplikonların görüntülenebilmesi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Amplikon sayısına bağlı olarak küçük (55 ml), orta (75 ml) ve büyük boy (110) agaroz tepsileri kullanıldı. İlk önce agaroz tozu (AppliChem) hassas terazide (SARTORIUS BA210S) tartıldı ve 1xTAE (Tris Asetat EDTA) tampon çözeltisinede çözdürüldü. Homojen çözünebilmesi için mikrodalga (VESTEL MV17) fırında 3 dakika boyunca ısıtma/kaynatma işlemi uygulandı. Sonra homojenize agaroz çözeltisine %0,01'lik etidyum bromid (Vivantis Biochemical) eklendi ve 10 sn karıştırıldı. Hazırlanmış olduğumuz agaroz çözelti, agaroz tepsisine boşaltıldı ve jelin donması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Son olarak agaroz jel elektroforez küvetine yerleştirildi.

3.3.3.2. Görüntüleme

PCR amplikonlarının görüntülenebilmesi için amplikonun 5 µl'sine 2 µl yükleme boyası (Bio-Rad) eklendi. Pipetajla karıştırıldıktan sonra jelde oluşturulan kuyucuklara konuldu. Amplikon büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100 bp'lik DNA marker (Fermentas) kullanıldı. Elektorforez 120 volt ve 30 dakika olarak uygulanıldı. PCR'la elde edilen amplikonların büyüklüğü jel görüntüleme sistemi (UVITECH Cambrige) ile FireReader Version 15 ve ultraviyole (UV) filtre kullanılarak kontrol edildi. Elde edilen görüntü UVIssoft-UVIBand yazılımı ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanlardan İzole Edilen *E. Coli*'nin Epidemiyolojik Olarak Tiplendirmesinin Yapılması.

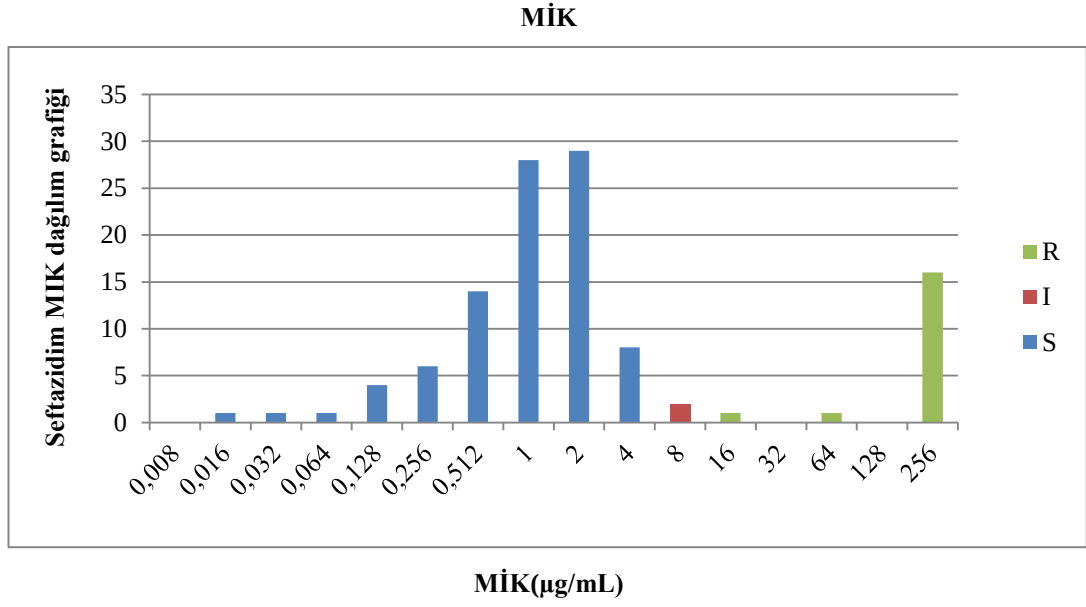
Araştırmada MDR *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin tespiti amacıyla CLSI'in kriterlerine uygun olarak fenotipik tarama ve doğrulama testleri ile genotipik moleküler yöntemler uygulandı. Fenotipik tarama ve doğrulama testleri Broth-mikrodilüsyon ve Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemleri ile genotipik testler ise PCR'le gerçekleştirildi.

4.1. Fenotipik Tarama ve Doğrulama Test Sonuçları

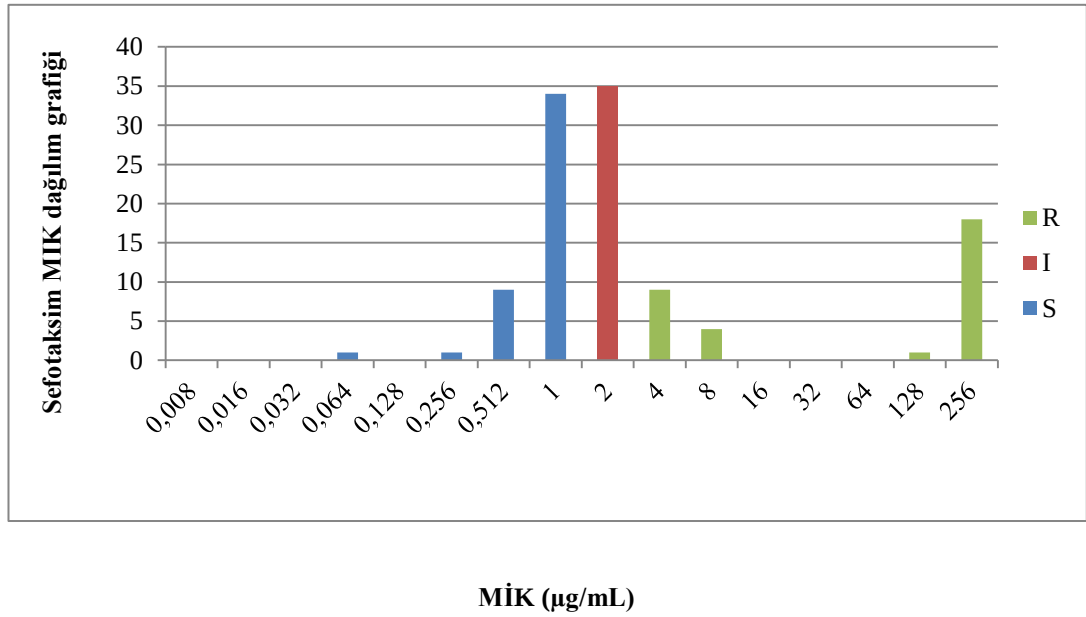
4.1.1. Broth Mikrodilüsyon Test Sonuçları

İncelenmeye alınan *E. coli* izolatlarının broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre CAZ ve CTX antimikrobiyallerine karşı MİK dağılımları Şekil'5 de MİK dağılım yüzdeleri ise Tablo 9'da gösterilmiştir. CAZ için en düşük konsantrasyon 0,016 µg/ml iken CTX için bu değer 0,064 µg/ml olarak bulunmuştur. En yüksek konsantrasyonlar ise hem CAZ hem de CTX antimikrobiyalleri için ≥ 256 µg/ml olarak bulunmuştur. CAZ için MİK dağılım yüzdelerine baktığımızda en yüksek frekansa sahip MİK 2 µg/ml olup 29 izolatda, CTX için ise en yüksek frekansa sahip MİK 2 µg/ml olup 35 izolatda tespit edilmiştir.

A



B



Şekil 5: Seftazidim ve sefotaksim için MİK dağılım grafikleri **(A)** seftazidim **(B)** sefotaksim
S: duyarlı; I: Orta duyarlı; R: dirençli

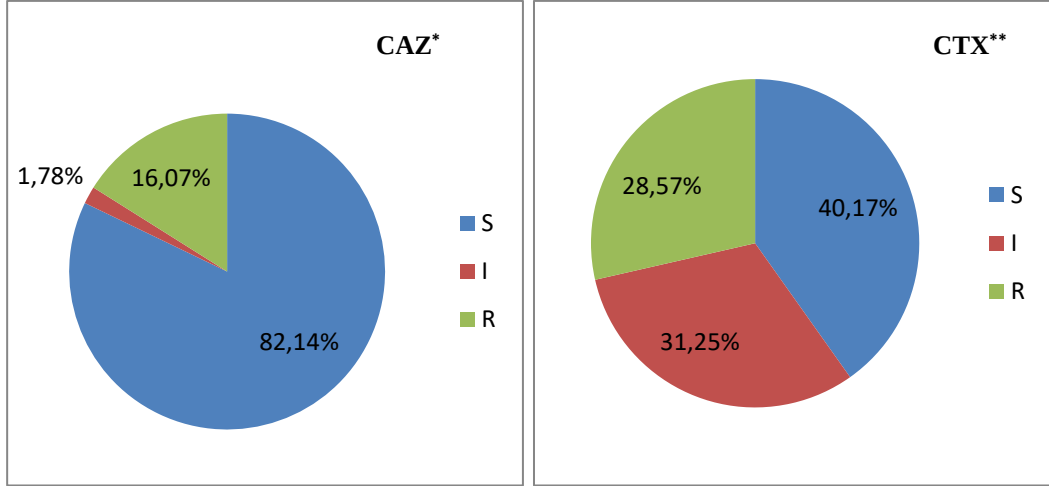
Tablo 9: Broth mikrodilüsyon yöntemine göre seftazidim ve sefotaksim için MİK dağılım yüzdeleri

Konsantrasyonlar µg/mL	Antimikrobiyaller			
	CAZ*		CTX**	
	n=112	%	n=112	%
0.008	0	0	0	0
0.016	1	0.89	0	0
0.032	1	0.89	0	0
0.064	1	0.89	1	0.89
0.128	4	3.57	0	0
0.256	6	5.35	1	0.89
0.512	14	12.5	9	8.03
1	28	25	34	30.35
2	29	25.89	35	31.25
4	8	7.14	9	8.03
8	2	1.78	4	3.57
16	1	0.89	0	0
32	0	0	0	0
64	1	0.89	0	0
128	0	0	1	0.89
256	16	14.28	18	16.07

*Seftazidim - CAZ

**Sefotaksim - CTX

CAZ ve CTX antimikrobiyallerin direnç profilleri Tablo 10’da gösterilmiştir. Antimikrobiyal dirençlilik oranları Şekil 6’da görülmek üzere CAZ için 92 izolat (%82,14) duyarlıyken, 2 izolat (%1,78) orta duyarlı, 18 izolat (%16,07) ise dirençli olarak belirlenmiştir. CTX için bu değerler sırasıyla 45 izolat (%40,17) duyarlı, 35 izolat (%31,25) orta duyarlı ve 32 izolat (%28,57) ise dirençli olarak belirlenmiştir



Şekil 6: Broth-mikrodilüsyon yöntemine göre izolatların seftazidim ve sefotaksim antimikrobiyelerine direnç oranları

*Seftazidim - CAZ

**Sefotaksim - CTX

S: duyarlı; I: Orta duyarlı; R: dirençli

Tablo 10. Broth-mikrodilüsyon yöntemine göre *E. coli* izolatların seftazidim ve sefotaksim antimikrobiyelerine dirençlilik paneli

MİK (µg/mL)								
İzolatlar	CAZ*	CTX**	İzolatlar	CAZ*	CTX**	İzolatlar	CAZ*	CTX**
	S≤ 4 R≥ 16	S≤ 1 R≥ 4		S≤ 4 R≥ 16	S≤ 1 R≥ 4		S≤ 4 R≥ 16	S≤ 1 R≥ 4
H1	2	2	E143	4	1	E211	0,512	2
H4	4	1	E144	2	1	E212	0,256	2
H11	8	4	E145	256	≥256	E213	1	4
E4	0,128	2	E146	≥256	≥256	E214	2	8
E6	2	0,512	E149	4	2	E215	0,016	1
E7	4	4	E150	2	2	E216	0,256	0,512
E8	1	8	E154	8	2	E222	≥256	256
E10	1	1	E156	256	≥256	E229	0,512	1
E11	1	2	E157	1	0,512	E233	0,512	4
E12	0,128	0,512	E158	4	2	E235	2	1
E13	0,512	1	E159	2	1	E236	0,512	2
E14	2	0,512	E160	1	2	E240	2	1
E18	≥256	≥256	E161	2	1	E245	2	8
E19	0,128	0,064	E162	≥256	≥256	E246	2	1
E20	1	2	E163	256	1	E248	2	4
E21	≥256	2	E164	2	1	E249	1	1
E23	≥256	≥256	E165	2	1	E250	1	2
E28	≥256	≥256	E167	2	2	E264	1	1
E31	2	2	E168	1	2	E265	0,512	4
E57	64	8	E172	256	128	E266	0,512	1
E64	2	2	E175	1	1	E267	0,512	2
E68	1	2	E176	1	0,512	E269	0,256	256
E87	≥256	≥256	E179	1	2	E272	1	4
E111	1	0,512	E182	0,128	0,512	E273	1	2
E112	≥256	≥256	E183	2	0,512	E274	2	2
E114	256	≥256	E189	1	≥256	E275	1	2
E116	≥256	≥256	E190	0,256	2	E277	2	2
E120	2	1	E194	0,512	1	E290	1	2
E125	0,064	1	E195	2	4	E296	0,512	1
E126	4	1	E201	1	1	E300	16	≥256
E130	1	2	E203	2	1	E301	1	2
E131	0,032	1	E204	0,256	2	E302	4	2
E135	2	1	E205	0,512	2	E303	0,512	2
E138	2	1	E206	2	0,256	E305	2	4
E139	1	1	E207	1	2	E306	0,512	≥256
E140	≥256	≥256	E208	0,512	1	E307	4	2
E141	2	1	E209	1	1	E. coli	≥256	1
E142	1	1	E210	0,256	≥256			

*Seftazidim - CAZ

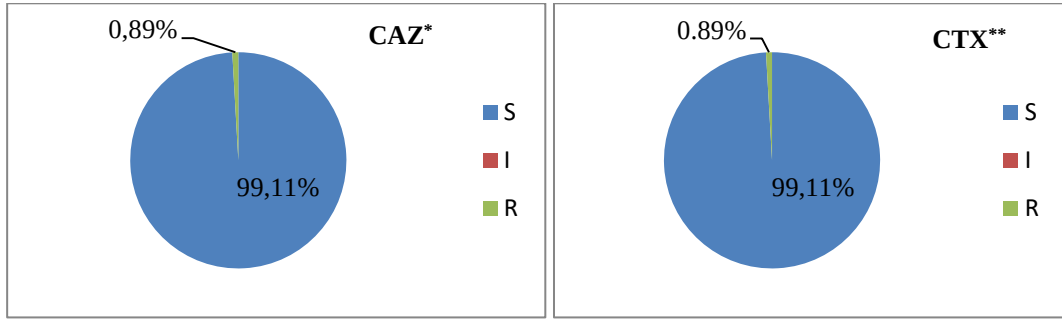
**Sefotaksim - CTX

S: duyarlı; I: Orta duyarlı; R: dirençli

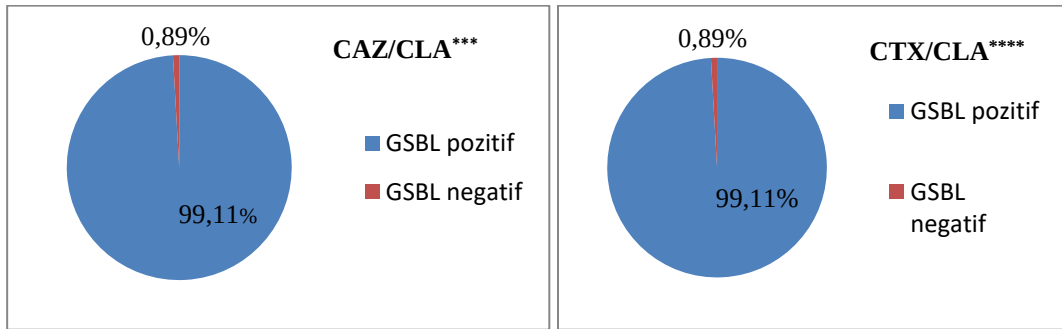
4.1.2. Disk Difüzyon Test Sonuçları

Araştırmaya dahil edilmiş 112 izolat GSBL varlığı açısından Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu ile CLSI standartlarına göre yapıldı ve değerlendirildi. Bu izolatların CAZ ve CTX antimicrobiyelerine hem tek başına hem klavulanik asitle kombinasyonlarının (CAZ/CLA ve CTX/CLA) dirençlilik oranları şekil 7’de gösterilmiştir. Her iki antimikrobiyal için 111 izolat (%99,11) duyarlı bulunurken, 1 izolat (%0,89) ise dirençli bulundu. Orta derecede duyarlı izolat tesbit edilmedi. Hem CAZ hem de CTX için dirençli bulunmuş olan 1 izolat GSBL pozitif olarak da belirlendi (Tablo 11).

A



B



Sekil 7. Kirby-Bauer Disk Difüzyon test sonuçlarına göre *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık oranları. (A) Kirby-Bauer Disk Difüzyon (B) Kombinasyon Disk Difüzyon

S: duyarlı; I: Orta duyarlı; R: dirençli

*Seftazidim - CAZ

**Sefotaksim - CTX

***Seftazidim/KlavulanikAsit - (CAZ/CLA)

****Sefotaksim/KlavulanikAsit - (CTX/CLA)

Tablo 11: İzolatların GSBL test sonuçları (konbinasyon disklerinin etrafındaki zon çapları klavulanik asit içermeyen zon çaplarına kıyasla 5 mm veya daha büyük olan izolatlar GSBL pozitif olarak kabul edildi (CLSI, 2016))

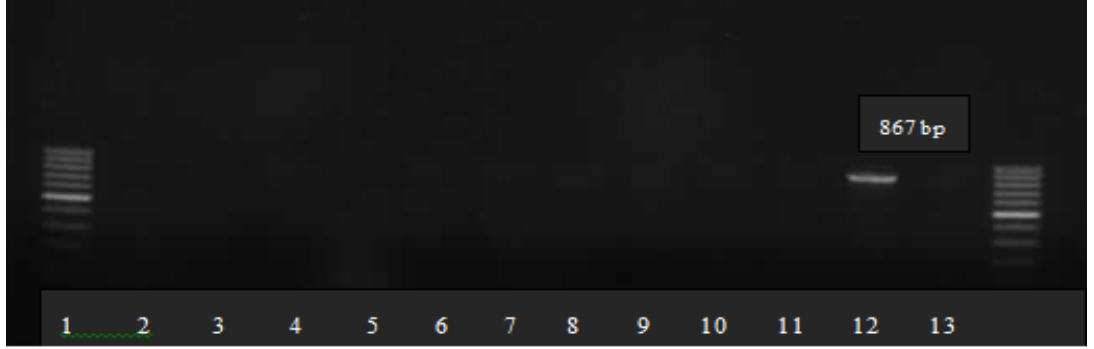
İzolatlar	CAZ*	CTX**	İzolatlar	CAZ*	CTX**	İzolatlar	CAZ*	CTX**
H1	-	-	E143	-	-	E211	-	-
H4	-	-	E144	-	-	E212	-	-
H11	-	-	E145	-	-	E213	-	-
E4	-	-	E146	-	-	E214	-	-
E6	-	-	E149	-	-	E215	-	-
E7	-	-	E150	-	-	E216	-	-
E8	-	-	E154	-	-	E222	-	-
E10	-	-	E156	-	-	E229	-	-
E11	-	-	E157	-	-	E233	-	-
E12	-	-	E158	-	-	E235	-	-
E13	-	-	E159	-	-	E236	-	-
E14	-	-	E160	-	-	E240	-	-
E18	-	-	E161	-	-	E245	-	-
E19	-	-	E162	-	-	E246	-	-
E20	-	-	E163	-	-	E248	-	-
E21	-	-	E164	-	-	E249	-	-
E23	-	-	E165	-	-	E250	-	-
E28	-	-	E167	-	-	E264	-	-
E31	-	-	E168	-	-	E265	-	-
E57	-	-	E172	-	-	E266	-	-
E64	-	-	E175	-	-	E267	-	-
E68	-	-	E176	-	-	E269	-	-
E87	+	+	E179	-	-	E272	-	-
E111	-	-	E182	-	-	E273	-	-
E112	-	-	E183	-	-	E274	-	-
E114	-	-	E189	-	-	E275	-	-
E116	-	-	E190	-	-	E277	-	-
E120	-	-	E194	-	-	E290	-	-
E125	-	-	E195	-	-	E296	-	-
E126	-	-	E201	-	-	E300	-	-
E130	-	-	E203	-	-	E301	-	-
E131	-	-	E204	-	-	E302	-	-
E135	-	-	E205	-	-	E303	-	-
E138	-	-	E206	-	-	E305	-	-
E139	-	-	E207	-	-	E306	-	-
E140	-	-	E208	-	-	E307	-	-
E141	-	-	E209	-	-	E.coli	-	-
E142	-	-	E210	-	-			

* Seftazidim - CAZ

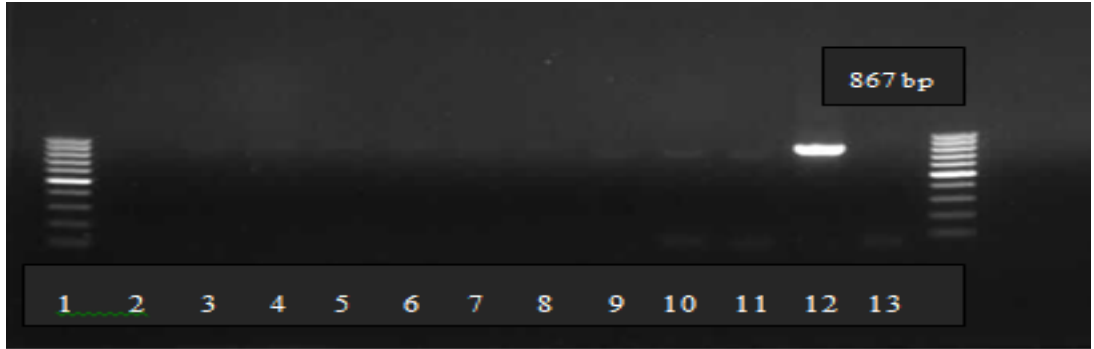
** Sefotaksim – CTX

4.2. Genotipik Test Sonuçları

Çalışmaya dahil edilmiş 112 adet *E. coli* izolatında β -laktamaz direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi amacıyla *bla_{SHV}* gen taraması yapıldı. Ancak hiçbir *E. coli* izolatında SHV geni tespit edilemedi (Şekil 8).



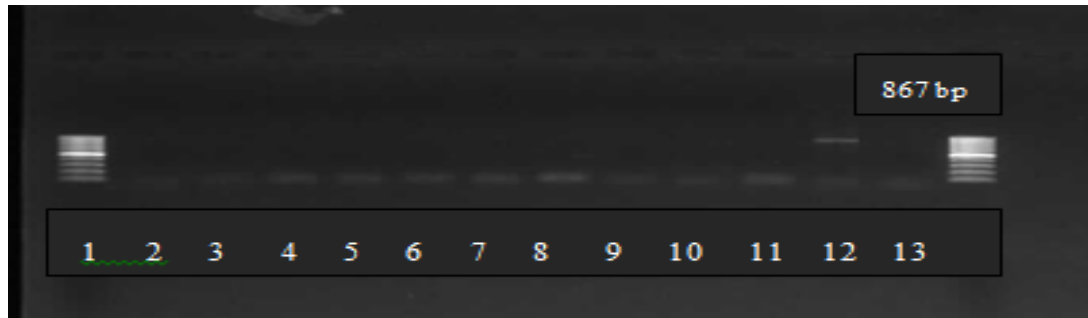
1:Ladder, 2:H1, 3:H4, 4:H11, 5:E4, 6:E6, 7:E7, 8:E8, 9:E10, 10:E11, 11: E12, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



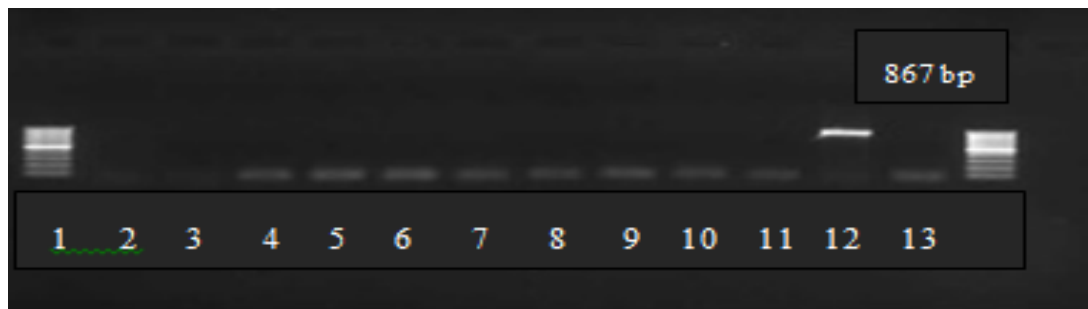
1:Ladder, 2: E13, 3:E14, 4:E18, 5:E19, 6:E20, 7:E21, 8:E23, 9:E28, 10:E31, 11: E57, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



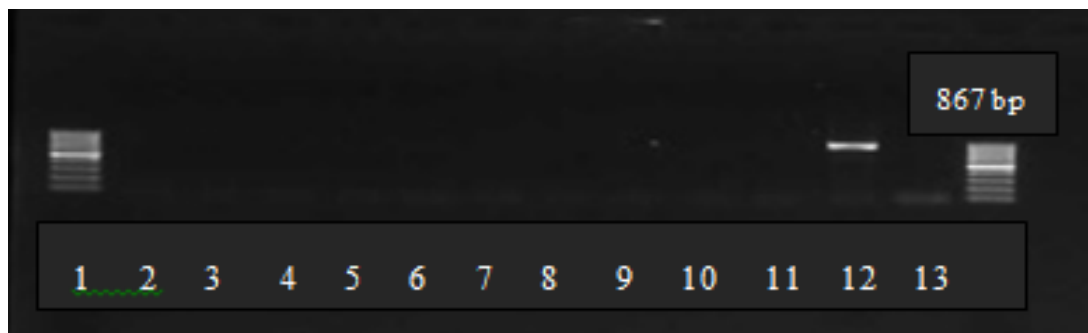
1:Ladder, 2: E64, 3:E68, 4:E87, 5:E111, 6:E112, 7:E114, 8:E116, 9:E120, 10:E125, 11: E126, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



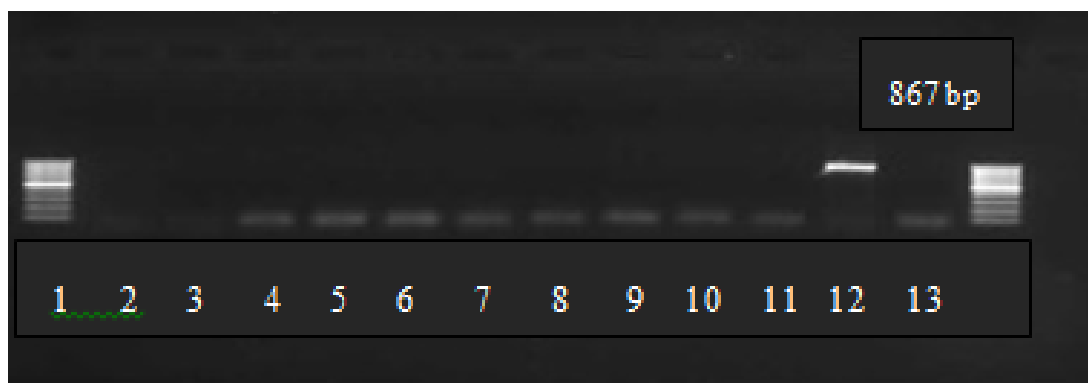
1:Ladder, 2:E130, 3:E131, 4:E135, 5:E138, 6:E139, 7:E140, 8:E141, 9:E142, 10:E143, 11: E144, 12:Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



1:Ladder, 2:E145, 3:E146, 4:E149, 5:E150, 6:E154, 7:E156, 8:E157, 9:E158, 10:E159, 11:160, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



1:Ladder, 2:E161, 3:E162, 4:E163, 5:E164, 6:E165, 7:E167, 8:E168, 9:E172, 10:E175, 11:176, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



1:Ladder, 2:E179, 3:E182, 4:E183, 5:E189, 6:E190, 7:E194, 8:E195, 9:E201, 10:E203, 11:204, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



1:Ladder, 2:E205, 3:E206, 4:E207, 5:E208, 6:E209, 7:E210, 8:E211, 9:E212, 10:E213, 11:214, 12:E215, 13:Pozitif kontrol, 14: Negatif kontrol



1: Ladder, 2: E216, 3: E222, 4: E229, 5: E233, 6: E235, 7: E236, 8: E240, 9: E245, 10: E246, 11: 248, 12: Pozitif kontrol, 13: Negatif kontrol



Şekil 12. *blaSHV* *E. coli* izolatlarına ait PCR görüntüsü.

1:Ladder, 2:E250, 3:E264, 4:E265, 5:E266, 6:E267, 7:E269, 8:E272, 9:E273, 10:E274, 11:275, 12: E277, 13: E290, 14: Pozitif kontrol, 15: Negatif kontrol



1:Ladder, 2:E296, 3:E300, 4:E301, 5:E302, 6:E303, 7:E305, 8:E306, 9:E307, 10:E.coli 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol

Şekil 8: *E. coli* suşlarının *blaSHV* gen grubu PCR sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Küresel olarak antimikrobiyallerin yüksek miktarda ve yanlış kullanımında ortaya çıkan direncin ciddi sorunlara neden olduğu bir gerçektir. β -laktamaz kökenli direnç, enfeksiyonların tedavisinde zorluklara ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Antimikrobiyal direnç oranları yıla ve bölgeye göre farklılıklar göstermektedir (Szmolka ve Nagy, 2013). Bu nedenle zamana ve bölgesel farklılıklara bağlı değişiklikler düzenli olarak izlenmelidir (Marques ve ark., 2016)

Ülke bazında, farklı coğrafik bölgelerde ve Türkiye’de yapılan çalışmalarda, antimikrobiyal direnç oranlarının yıllar içerisinde belirgin artışı dikkati çekmektedir. Türkiye’de 2004 yılında GSBL üretim oranı %3,8 iken 2005 yılında %5,9, 2006 yılında %9,4, 2007 yılında %13,7 ve 2008 yılında %17,2 olarak bildirilmiştir (Akyar, 2010).

Bu araştırmada broth mikrodilüsyon test sonuçlarına göre CAZ için en düşük MİK’i 0,016 $\mu\text{g/ml}$ iken CTX için bu değer 0,064 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. En yüksek MİK’ler ise hem CAZ ve hem de CTX için $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. CAZ için en yüksek frekansa sahip MİK 2 $\mu\text{g/ml}$ olup 29 izolatta tespit edilmiştir. CTX için ise en yüksek frekansa sahip MİK 2 $\mu\text{g/ml}$ olup 35 izolatta tespit edilmiştir. Antimikrobiyal dirençlilik oranları CAZ için %82,14 duyarlı, %1,78 orta duyarlı, %16,07 dirençli olarak bulunmuştur. CTX için bu değerler %40,17 duyarlı, %31,25 orta duyarlı, %28,57 oranında dirençli olarak belirlenmiştir. *E. coli* izolatlarının CAZ ve CTX’e karşı dirençlilik oranları daha önce yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre sırasıyla %32 ve %37 oranında dirençli bulunmuştur (Aydemir ve ark., 2006). Bir başka araştırmada ise benzer şekilde CAZ ve CTX’e karşı sırasıyla %37 ve %38,5 oranlarında dirençli olduğu tesbit edilmiştir. (Duman ve ark., 2010). İran’da yapılan bir araştırmada *E. coli* izolatlarının GSBL direnç profilleri araştırılmış, CAZ

için %30,55 ve CTX için %51,15 oranında direç tesbit edilmiştir. Bu bulgu direncin yaygınlığının önemli bir göstergesidir.

Bazı araştırmaların sonuçlarına göre GSBL pozitif bulunan ancak CLSI'nin kriterlerine göre GSBL negatif olarak nitelenen suşların oranı % 75'lere kadar ulaşabilir ve yeni araştırmalara göre bu tür izolatlarda AmpC β -laktamaz varlığı gözlenmiştir (Robberts ve ark., 2009). AmpC β -laktamazlar GSBL'de olduğu gibi rutin duyarlılık testinde CAZ ve CTX gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı duyarlı görünmekte ve bu ilaçlarla yapılan tedavi başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (Coşkun ve Altanlar, 2012). Deveci ve ark. (2010) idrar kültürlerinden izole edilen 139 adet *E. coli* izolatına Kirby-Bauer disk difüzyon testi uygulayarak β -laktamaz varlığını araştırmış ve 18 izolatın (%13.0) GSBL pozitif olduğunu tespit etmiştir. Karagöz ve ark. (2013) GSBL üreten suşları incelenmiş, 2011 yılındaki FEP ve CAZ direncinin bir önceki yıla göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemiştir. Elde edilen bu sonusun 2011 yılında CLSI kriterlerinin GSBL üreten suşlar için sefalosporin kullanımı ile ilgili olarak yapılan değişikliklerle alakalı olduğu düşünülmektedir. GSBL'ler plazmid ve transpozon aracılığı ile başka suşlara aktarılabilir. GSBL üreten bakterilerde kinolon ve aminoglikozid grubu bileşikler ile trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) gibi ilaçlara karşı direnç yaygındır (Kuzucu ve ark., 2010). Örneğin GSBL pozitif bakterilerde, TMP-SMX ve gentamisin duyarlılığının sırasıyla %33,1, %28,7 ve %49,3 olduğu belirlenmiştir. Şahintürk ve ark (2017) araştırmalarında *E. coli* izolatlarının 14 farklı antimikrobiyale karşı dirençli olduğunu tesbit etmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre toplam MİK'in 565-2520 $\mu\text{g/ml}$ aralığında bulunduğunu, 20 *E. coli* izolatına karşı nalidiksik asit (NAL), enrofloksasin (ENR), danoflaksasin (DAN), orbifolksasin (ORB), moksifloksasin (MOX), eritromisin (ERY), kloromfenikol (CHL), TMP-SMX, AMP ve CTX MİK'lerinin klinik duyarlılık eşik değerlerini aştığını ve 19 izolatın test edilen tüm bileşiklere karşı dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmada seçilen *E. coli* izolatları Şahintürk ve ark (2017) tarafından test edilen izolatlarla aynı klonlara aittir. Bu bakımdan daha önce MDR direnci yüksek bulunan *E. coli* izolatlarında GSBL pozitif izolat sayısı çok düşük bulunmuştur. Bu veriye göre MDR ve GSBL ilişkisini inceleyen (Kuzucu ve ark. 2010) bir araştırma sonucunun aksine MDR pozitif izolatlarda GSBL pozitifliği her zaman yüksek

olmayabilir. Aslantaş ve ark. (2016) Hatay’da sığırlardan izole edilen GSBL ve plazmid aracılı AmpC tip β -laktamaz-pozitif *E. coli* prevalansını incelemiştir. Bu araştırmada GSBL fenotipi disk kombinasyon ve çift disk sinerji testi ile değerlendirilmiştir. β -laktamaz (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} ve *bla*_{TEM}) ve plazmid aracılı kinolon direnç genleri (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *aac(6’)-Ib*) PCR ile ve daha sonra sekans analizi ile araştırılmıştır. 26 izolat (%8,3) GSBL üretimi yönünden fenotipik test sonuçlarına göre pozitif bulunmuştur. Bu izolatlarda *bla*_{CTX-M-15} (n= 12), *bla*_{CTX-M-1} (n= 11), *bla*_{CTX-M-3} (n= 2) ve *bla*_{CMY-2} (n=1) genleri belirlenmiştir. Florokinolon aracılı direnç genleri GSBL-pozitif 11 adet *E. coli* izolatında (%42,3) saptanmıştır. Bu araştırmada 112 *E. coli* izolatı GSBL varlığı açısından Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile incelenmiş ve sonuçlar CLSI standartlarına göre yorumlanmıştır. Bu izolatların CAZ ve CTX antimikrobiyallerine karşı bireysel ve klavulanik asit kombinasyonlarına karşı dirençlilik oranları incelendiğinde her iki antimikrobiyal için 111 adet izolat duyarlı olarak nitelenirken sadece 1 adet izolat ise dirençli bulunmuştur. Orta duyarlı *E. coli* izolatı tespit edilememiştir. Hem CAZ hem de CTX’e karşı dirençli bulunan 1 adet izolat GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bu araştırmada hayvanlardan izole edilen MAR *E. coli* izolatlarının GSBL direncinin fenotip ve genotipini karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 112 *E. coli* izolatının fenotipik olarak CAZ ve CTX antimikrobiyallerine dirençlilikleri broth-mikrodilüsyon ve disk difüzyon testleri kullanılarak, genotipik olarak ise PCR testi kullanılarak analizi yapıldı.

E.coli kültür koleksiyonundan seçilmiş 112 adet *E.coli* izolatından broth-mikrodilüsyon yöntemleriyle yapılmış olan CAZ ve CTX karşı sırasıyla %16,07 ve %28,57 oranlarında direnç tesbit edilmiştir. Bu antimikrobiyallerin disk difüzyon yöntemi ile yapılmış olan test sonuçlarına göre her iki antimikrobiyale karşı %0.89 oranında direnç tesbit edilmiştir. GSBL varlığı acısında fenotipik test sonuçların göre sadece 1 izolatda GSBL pozitifliği görülmüştür.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre dirençli ve MDR *E. coli* izolatlarının tek başına kullanılan β -laktam grubu bileşiklere karşı önemli düzeyde duyarlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir. Ancak GSBL nitelenmesi için gerekli olan klinik eşik

değerlere sahip izolat sayısı çok düşüktür. Bu nedenle MDR ve GSBL arasında bağımlı ilişki değerlendirildiğinde GSBL varlığının her zaman MDR ile ilişkilendirilemeyeceği öngörülebilir.

6. KAYNAKLAR

Akçam FZ, Gönen I, Kaya O, et al (2004) Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterlerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. Süleyman Demirel Tıp Fakültesi Dergisi 11: 6-9.

Akova M. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. (2004): Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar ve klinik önemi. Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; s: 85-95.

Aksoy A, Göçmen JS, Kaçmaz B et al (2005) İnsan ve sığırlardan izole edilen fekal *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik direnci ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi. Ankem Dergisi 19: 130-4.

Aksöz M (2009) Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli*'de Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, et al (2010) Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. Ankem Dergisi, 24: 34-41.

Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF et al (2013) *Escherichia coli* in Europe: An Overview. International Journal of Environmental Research and Public Health. 10: 6235-6254.

Ambler RP (1980) The structure of beta lactamases. Philosophical Transactions of The Royal Society B, Biological Sciences, 1980; 289: 321-31.

Aslantaş Ö, Elmacıoğlu S, Yılmaz EŞ (2016). "Prevalence and Characterization of ESBL-and AmpC-Producing *Escherichia Coli* From Cattle" Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 23: 63-67.

Ayaz, C (2008) Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Willke-Topçu A, Söyletir G, Doganay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s: 266-278.

Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R (2006) *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Dergisi, 19: 63- 8.

Bal Ç (2003) Beta-Laktamazlar: Güncel Durum. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Flora 8: 111-123

Bali EB (2007) *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* suşlarında plazmit veya kromozomal kaynaklı genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması ve moleküler yönden incelenmesi, Ankara. Gazi Üniversitesi, Doktora Tezi.

Bano Rodriguez J, Alcalá J, Cisneros JM, et al (2009) *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum β -lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother.*, 63(4): 781-4,

Bedir SK (2006) Bazı klinik bakterilerdeki beta-laktamazların jel elektroforetik analizi. Ankara Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Bilgehan H (2000) *Enterobacteriaceae*, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 10. baskı, İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. s: 1-102.

Bradford PA (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 933-951.

Bruner W, Schmidt H, Karch H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V, *Molecular Microbiology*, 24, 767-778

Bush K (1989) Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 264-70.

Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 969-76, 2010.

Caniglia Fernandez L, Cejas D, Gutkind G, Radice M (2015). Detection and genetic characterization of β -lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe*, 33: 8-13.

Cengiz M, Büyükcangaz E, Arslan E et al (2012) Molecular characterization of quinolone resistance in *Escherichia coli* from animals in Turkey. *Veterinary Record* 171: 155-159.

Cengiz T (2004) Antibiyotik ve Kemoteropatiklerin Etki Mekanizmaları I-II. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara Güneş Kitabevi. s: 246-266.

Çetinkaya F (2008). Penisilin ve diğer beta-laktam antibiyotik alerjilerinde son görüşler. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi: 43: 36-39

CLSI (2016) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Edition M02-A12, M07-A10, and M11-A8.

CLSI (2012) Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Ninth Edition. Approved standard M7-A9.

Coşkun S, Altanlar N (2012) Sefoksitine Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Tespiti. Mikrobiyoloji Bülteni ; 46: 375-385

Çöleri A, Çökmüş C (2008) Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 65: 87- 96.

Danel, F, Hall LMC, Gur D et al (1995) OXA-14, another extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother 39: 1881-1884

Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdas G (2010) Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oranları, Ankem Dergisi 19: 84–7

Demir N (2006) Gram Negatif Bakterilerde GSBL Üretimine Katkıda Bulunan Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması. İstanbul, Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi.

Demirtürk N, Demirdal T (2004) Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Kocatepe Tıp Dergisi 5: 17- 21

Deveci Ö, Yula E, Tekin A (2010). İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik direnci. Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 3: 182-186

Dinç G, Ata Z, Temelli S (2012) Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 59: 85-8.

Duman Y, Güçlüer N, Serinda AM et al (2010) ‘*Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. Fırat Tıp Dergisi 15: 197-200

Durmaz R (2009) Direnç Gelişimini Önlemede Moleküler Mikrobiyolojinin Katkısı. Ankem Dergisi 23(Ek 2): 111-115.

Durupınar, B (2001) Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler, Klimik dergisi, 14, 2, 47-56.

ECDC (2014) Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

Edwards JR, Fung DY (2006) Prevention and decontamination of Escherichia coli O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. J. of Rapid Methods and Automation in Microbiology 14: 195

Eftkhar, F, Rafiee, R (2005) An overlay gel method for identification and isolation of bacterial beta-lactamases. Journal of Microbiological Methods, Article in press.

Ewers C, Bethe A, Semmler T (2012) Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: A global perspective. Clinical microbiology and infections 18: 646-655.

Forbes A, While A, Dyson L et al (2003). Impact of clinical nurse specialists in multiple sclerosis - synthesis of the evidence. Journal of Advanced Nursing, 42: 442-462.

Göker G. (2007) poliklinik hastalarının çeşitli klinik örneklerinden etken olarak izole edilen escherichia coli ve klebsiella cinsi bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığının araştırılması. İstanbul üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi.

Gülay Z (1999) Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. First Edition. Ankara: Güneş Kitapevi s: 91-112.

Gür D (1996) Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi, 1; 80-86.

Heritage J, Zali FH, Gascoyne-Birizi D, Hawkoy PM (1999) Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria", J. Antimicrob. Chemother 44: 309-18.

Jacoby GA, Bush K (2014) β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitör resistant enzymes. Lahey Clinic. Erişim 26.12.2018 <http://www.lahey.org/Studies/>.

Jacoby, GA (2009) AmpC-Lactamases. Clinical Microbiology Reviews 22: 161–182. Jasser-Al AM (2006) Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global problem. Kuwait Medical J 38: 171-185.

Jenkins SG, Schuetz An (2012) Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. Symposium on Antimicrobial Therapy, MayoClinProc 87: 290-308

Jorgensen JH, Ferraro MJ (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases 49: 1749-1755.

Kamburoğlu A (2011) Genişlemiş-spektrumlu beta laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella spp. İzolatlarında Beta Laktamaz Direncinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Karagöz G, Kadanalı A, Dede B et al (2013). *Escherichia Coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Direnç Oranları, TAF Preventive Medicine Bulletin, 12: 291-296.

Karakoç AE (2004) Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Bakterilerde Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Yorumlama Kriterleri. İçinde: Arman D, Leblebicioğlu H, editörler. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Gram-Negatif Mikroorganizmalar ve Direnç Sorunu, İnfeksiyon Hastalıkları Tedavi Dizisi 9. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi s: 33-48.

Kiratisin P, Henprasert A(2010) Genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases amongst Enterobacteriaceae other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to broadspectrum cephalosporin. Int J Antimicrob Agents 36: 343-347

Kizirgil A, Yakupoğulları Y, Keçebaş AA, Seyrek A, Aşçı Toraman Z (2004) GSBL üreten bakterilere karşı beta-laktamaz inhibitörü içeren kombinasyonların etkinliği. 11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart-3 Nisan 2003 İstanbul), Program ve Özet Kitabı'nda. İstanbul: Klimik Derneği, 2003:35

Kucheri R, Dasgupta P, Sacks SH et al (2005) Urinary tract infections: new insights into a common problem. Postgraduate Medicine 81: 83-86.

Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S et al (2010). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Spp. Suşlarının Ertapenem ve Diğer Karbapenemlere Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması”, 3. Türkiye EKMUD Kongresi.

Lee K, Lee WG, Uh Y (2003) VIM- ve IMP- tipi metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. Emerg Infect Dis 9: 868-71.

Li R, Oliver R A, Townsend CA (2017) Identification and Characterization of the Sulfazecin Monobactam Biosynthetic Gene Cluster, Cell Chemical Biology, 24: 24-34

Liarrul LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S (2010) The future of β -lactams. Curr Opinion in Microbiol 13:551-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.008>

Livermore DM (1995) b-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 8: 557-584.

Llanes R, Gonzales M, Martinez, I, Sosa J, Guzman D, Gutierrez, O, Llop A Sanches L (2003) Evaluation of four methods for detecting the betalactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98: 1089-1091.

Luzzaro F, Mezzaresta M, Mugnaioli C, et al (2006) Trends in Production of Extended-Spectrum Beta lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey, Journal of Clinical Microbiology 44: 1659–6

Marques C, Gama LT, Belas A et al (2016) European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. BMC Veterinary Research 12 (1): 213.

Mazel D, Davies J (1999) Antibiotic resistance in microbes. Cell Mol Life Sci Nov 30, 56: 742-54.

Murray PR, Baron E, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009) Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık, s: 1077-1083.

Omerovic M, Müştak HK, Kaya İB (2017). Escherichia coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 28: 1-6

Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA (2000) Mechanisms of antibiotic resistance, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone 236- 252.

Önnberg A, Mölling P, Zimmermann J, Söderquist B (2011). Molecular and phenotypic characterization of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. APMIS, 119: 287–295.

Öncül O (2002) Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum dizisi 31: 23-38.

Özbaş ZY, Aytaç SA (1995) Escherichia coli 0157:H7: Epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 52: 47-53.

Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A (2001) Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. Flora, 6: 3-23.

Öztürkeri H (1997) Streptococcus pneumoniae`de penisiline direnç mekanizmaları. Klinik Dergisi 10: 51-4.

Peterson DL, Bonomo RA, et al. (2005) Extended-Spectrum BetaLactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews 657– 686

Pfaller MA, Opal Segreti J (2006) Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. Clinical Infectious Diseases 42: 153-63.

- Pitout JD, Hanson ND, Church DL (2004) Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clinical Infectious Diseases* 38: 1736-41.
- Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L, et al. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 52–59.
- Prescott JF, Giguère S, Dowling PM (2013). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th edition, Blackwell Publishing
- Prinakaris, EE, Miriagou V, Tzelepi E et al (1997) Emergence of an inhibitor-resistance beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 838-840
- Rasheed JK, Jay C, Metchock B et al. (1997) Evolution of ExtendedSpectrum Beta-Lactam Resistance (SHV-8) in a Strain of *Escherichia coli* 74 during Multiple Episodes of Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 647–653.
- Rice LB, Bonomo RA (2007) Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA eds. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press Washington, pp: 1114-1145.
- Richmond MH, Sykes RB (1973) The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology* 9: 31-88.
- Robberts FJL, Kohner PC, Patel R (2009). Unreliable extended-spectrum β – lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 358-361.
- Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, et al (2005) Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum b-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 11: 625–631
- Sanders CC, Sanders WE (1992) Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clinical Infectious Diseases*, 14: 1089-1099.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S et al (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 1, 90-101.
- Su Y, Yu CY, Tsai Y et al (2014) Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, doi:10.1016/j.jmii.2014.10.003.
- Szmolka A, Nagy B (2013) Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology* 4: 258.

Şahintürk P (2018) Dirençli *escherichia coli* eliminasyonu için yeni antimikrobiyal kombinasyonların araştırılması. Bursa Uludag Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.

Şahintürk P, Arslan E, Büyükcangaz E et al (2016). High level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from animals in Turkey is due to multiple mechanisms. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 40: 214–218.

Şihca S, Demirdöğen E, Dıgırak M (2012) Kahramanmaraş'ta Kliniklere Başvuran Hastalardan İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science and Engineering Journal 2: 47-52.

Thenmozhi, S, Moorthy K, Sureshkumar BT et al (2014) Antibiotic Resistance Mechanism of ESBL Producing Enterobacteriaceae in Clinical Field: International Journal of Pure and Applied Bioscience, 2: 207-226.

Töreci K (2002) *Escherichia* türleri. In: Topçu AW. Söyletir G. Doğanay M. Editör. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 2 baskı, İstanbul Nobel Tıp kitap evleri, s: 1564-157

Wang HH, Manuzon M, Lehman, M. Wan, K, Luo H, Wittum T E., et al.. (2006) Food Commensal Microbes as a Potentially Important Avenue in Transmitting Antibiotic Resistance Genes. FEMS Microbiology Letters. 254: 226-231

WHO (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance, World Health Organization.

Winn S, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckeberger G, Koneman E (2006) Antimicrobial susceptibility testing. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 8th edition, United States of America, Lippincott Williams&Wilkins, Chapter 17, p.945-963.

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 57: 154-5.

Yıldız İ, Varkal MA, Ünüvar M (2014) Günümüzde Sefalosporinler ve Antibiyotik Direnci Çocuk Dergisi 14: 22-27.

Yılmaz N, Ağuş N, Köse Ş, et al (2008). Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz Salgılayan *Escherichia Coli* ve *Klebsiella Pneumoniae* Suşlarının Ertapenem ve Diğer Antibiyotiklere Duyarlılıkları, Türk Mikrobiyal Cem Derg, 39: 80-84

Yokoyoma T, Honda J, Kawayama T et al (1996) Increased incidence of betalactamase plazmid negative, high level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Kurume Med J 43: 199-206.

Yoldaş MA (2007) Enterik Bakterilerde Hızlı Antibiyotik Duyarlılık Testi İçin Yeni Bir Besiyeri Gelistirilmesi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Doktora Tezi

Yoneyama H, Katsumata R (2006) Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Biosci Biotechnol Biochem,70: 1060-75

Yüce A (2001) Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. Klimik Dergisi. 14: 41- 46.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

A

<i>A. baumannii</i> :	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AIEC :	Adherent invazif <i>E. Coli</i>
AMP:	Antimikrobiyal peptidler
APEC :	Avian patojenik <i>E. coli</i>
ATCC :	American Type Culture Collection
ATM:	Aztreonam

B

Bp :	Baz çifti (Base pair)
------	-----------------------

C

CAZ :	Seftazidim
cfu :	Colony forming unit
CHL :	Kloromfenikol
CLSI :	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX :	Sefotaksim
°C :	Santigrat

D

DAEC :	Diffuz adherent <i>E. coli</i>
DAN:	Danoflaksasin
DNA :	Deoksiribonükleik asit

E

<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. aerogenes</i> :	<i>Enterobacter aerogenes</i>
EAEC :	Enteroagregatif <i>E. coli</i>
ECDC:	European Center for Disease Control and Prevention
EHEC :	Enterohemarajik <i>E. coli</i>
EIEC :	Enteroinvazif <i>E. coli</i>
EMB:	Eozin-Metilen Blue
ENR:	Enrofloksasin
ERY:	Eritromisin
EPEC :	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ESBL :	Geniş spektrumlu β -laktamaz
ETEC :	Enterotoksijenik <i>E. Coli</i>

F

F:	Primer : Forward primer
FEP :	Sefepim

G

GSBL:	Geniş spektrumlu β -laktamaz
g :	Yer çekimi kuvveti (Gravity force)

K

<i>K. pneumonia:</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
----------------------	------------------------------

L

L:	Litre
----	-------

M

MBK :	Minimum bakterisidal konsantrasyon
-------	------------------------------------

MDR : Çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance)

mg/kg : Miligram/kilogram

µg : Mikrogram

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

µm : Mikrometre

MİK : Minimum inhibitör konsantrasyon

MOX: Moksifloksasin

N

NAGA: N-asetil glukozamin

NAL: Nalidiksik asit

NAMA : N-asetil muramik asit

NMEC : Neonatal menenjit *E. coli*

O

ORB: Orbifolksasin

P

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PBP : Penisilin bağlayan protein

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)

PCR-SSCP: PCR-Single-Strand conformational polymorphism analysis

ph Power of Hydrogen

S

S: Duyarlı

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. enterica: *Salmonella enterica*

SS. typhimurium: *Salmonella typhimurium*

S. maltophilia : *Stenotrophomonas maltophilia*

Sn: Saniye

STEC: Shiga toksini üreten *E. Coli*

T

TAE: Tris Asetat EDTA

TMP-SMX: Trimetoprim-sulfametoksazol

U

UPEC: Üropatojenik *E. coli*

UV: Ultraviyole

W

WASP: Otomatik spiral yayıcı sistem (Whitley's Automatic Spiral Plater)

WHO: World Health Organization

8. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, bana yeni bir bakış açısı kazandıran danışman hocam sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ başta olmak üzere Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Songül SONAL ve Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana her türlü yardımcı olan Araş. Gör. Pınar ŞAHİNTÜRK, Dok. Öğr. Gülçe HEPBOSTANCI, Dok. Öğr. Meltem ÇAYCI ve Dok. Öğr. Elif ÜSTÜNLÜOĞLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Eğitimi süresince bana hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Rovshan GURBANLI, Rashad SARIYEV, Jamil JAMIYEV, Nijat IBRAHIMLI ve Samig GOYUSHOV'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimim boyunca bana her zaman maddi ve manavi destek olan, saygı değer insanlar, annem Naila HUSEYİNOVA, babam Valeh IBRAHIMOV ve abim Aydın IBRAHIMLI'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

Azerbaycan'ın Gazah şehrinde 1994 yılında doğdum. 2011 yılında Azerbaycan Devlet Tarım Üniversitesi, Veteriner Fakültesinde Lisans eğitime başladım. 2014-2015 senesinde Türkiyede Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesinde Mevlana Değişim Programı ile eğitime devam ettim. Üniversite eğitimimin son senesinde Almanyada bulunan sütçü sığır çiftliğinde 4 aylık staj yaptım. 2016 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladım.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Ulvi İBRAHİMLİ
Tez Adı	Çoklu Antimikrobiyal Dirençli <i>Escherichia Coli</i> 'de Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz Direncinin Karakterizasyonu
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner-Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Tez Danışman(lar)ı	Doç. Dr. Murat CENGİZ
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	☐ Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☒ Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☐ Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	☒ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum ☐ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl ☐ 2 yıl ☐ 3 yıl ☐ ☐ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 11/09/2019

İmza :

