

ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA
LAKTAMAZLARIN (GSBL) SAPTANMASINDA KULLANILAN BAZI
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI VE GSBL ÜRETİM SIKLIĞININ
BELİRLENMESİ

AYŞE BİLGE SİPAHİ

GİRİŞ

Antibiyotik direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açmakta ve giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni antibakteriyel ilaçların klinik tedavide uygulanması bu ilaçlara karşı dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile sonlanmaktadır (12, 26, 65).

Beta laktam antibiyotiklerin çok sık kullanılmaları tüm dünyada beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin giderek artmasına ve etkilerinin azalmasına neden olmuştur (12).

Bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarından en sık görülenlerinden biri sentezledikleri enzimlerle ilacın inaktive edilmesidir. Beta laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden beta laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örnektir (28, 44, 71, 82). Ancak rutin olarak uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri beta laktamaz üretimini ve buna bağlı olarak beta laktam direncini doğru olarak belirlemede yetersizdir. Bu testlerle laboratuvar ortamında beta laktam antibiyotiklere duyarlı oldukları gösterilen bazı

Enterobacteriaceae suşlarıyla meydana gelen infeksiyonlarda tedavide başarısızlık ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle *Enterobacteriaceae* suşlarında beta laktamazalara bağlı antibiyotik direncinin doğru olarak saptanması için farklı yöntemler geliştirilmiştir (61).

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) sıklığının belirlenmesi, GSBL enzimlerinin doğru olarak nasıl, hangi testlerle saptanabileceğinin araştırılması ve günümüzde kullanılan GSBL saptama yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, iş gücü ve harcanan zaman gibi özellikleri göz önünde bulundurularak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BETA LAKTAMAZLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Beta laktamazların sentezi ve hücredeki yeri

Beta laktamazlar kromozomal genler veya plazmide bağımlı genler tarafından sentezlenebilirler. Plazmidler antimikrobiyal direncin yayılmasında en önemli nedenlerinden biridir (8). Gram pozitif bakterilerde, beta laktamazlar ekzoenzimler olarak hücre membranından dışarıya salgılanırlar ve bu nedenle ilaç inaktivasyonu için gereken enzim miktarı fazladır. Gram negatif bakterilerde ise enzim periplazmik alanda bulunur ve bu nedenle az miktarda enzim bile, antibiyotiklerin sitoplazmik membrana bağlı penisilin bağlayan proteinlere ulaşmalarından önce etkisiz hale getirilmesine neden olur (28, 40, 44, 72).

Beta laktamazların etki mekanizmaları

1975'te Spratt beta laktam antibiyotiklerin hedef molekülünün penisilin bağlayan proteinler (PBP) olduğunu tanımlamıştır. PBP' ler bakteri sitoplazmik membranında bulunan, peptidoglikan sentezinde görev yapan çeşitli enzimlerdir. Transpeptidaz, karboksipeptidaz veya glikozil transferaz yapısında olabilirler. Beta laktam antibiyotikler kovalan bağlarla bu moleküllere bağlanırlar, peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve böylece bakteri üremesini engellerler (7, 37, 47, 68).

Gram negatif bakteriler beta laktam antibiyotiklere karşı başlıca üç yolla direnç geliştirirler (68, 82) :

- 1-Dış membrandan geçmek için gereken kanalların daralması ve bazı kanalların sayılarının azalması,
- 2-Beta laktam antibiyotikleri parçalayan beta laktamaz enzimlerinin sentezlenmesi,
- 3-Beta laktam antibiyotiklerin bağlanarak etkilerini gösterdikleri PBP yapısında değişiklik yaparak antibiyotiğin bağlanmasının engellenmesi,

Beta laktamazlar, antibiyotikleri hedef bölgesine erişmeden beta laktam halkasını hidrolize ederek etkisiz hale getirirler (37, 40, 72). Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağlarını parçalarlar. Substratları olan antibiyotik ile karşılıklı etkileşerek kompleks bir ara ürün oluştururlar. Daha sonra bu kompleks su ile hidrolize olur. Aktif enzim tekrar serbestleşir ve yeni beta laktam molekülleriyle etkileşime girer. Açığa çıkan beta laktam antibiyotiklerin asidik deriveleri etkisiz hale gelir ve antibakteriyel özelliklerini kaybederler (9, 68, 82).

A, C ve D grubunda yer alan beta laktamazların aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunmaktadır. B grubundaki beta laktamazların aktif bölgesinde farklı olarak çinko içeren enzimler bulunur (40, 72).

Beta Laktamazların Sınıflandırılması

Beta laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu farklı substrat özgüllüğü gösteren çok çeşit ve sayıda beta laktamaz enzimi saptanmıştır. Penisilinin geliştirilmesinden sonraki yirmi yıl içinde penisilnaz sentezleyen stafilokoklar tüm dünyada yayılmış,

1960’lardan sonra yarı sentetik penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlerin keşfedilmesi ile Gram negatif basillerde bulunan beta laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Yirmibeş yıl boyunca Gram negatif basillerde bulunan beta laktamazlar bir kaç çeşit ile sınırlı kalmış, ancak 1978’ten sonra birçok yeni beta laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile eş zamanlı olarak beta laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir (Tablo-I) (8, 49). Buna bağlı olarak bu enzimlerin gruplandırılması gerekli görülmüş ve farklı zamanlarda bir çok sınıflandırma şeması önerilmiştir (28, 49). Yaygın olarak kabul gören ilk sınıflandırma şeması 1960’larda Richmond ve Sykes tarafından önerilmiştir. Ancak zamanla bu şemada hatalar ve eksiklikler görülünce 1989’da Karen Bush tarafından değiştirilmiştir. Günümüzde en sık kullanılan şemalardan biri olan sınıflama substrat profilleri ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temel alınarak 1995 yılında Bush-Jacoby-Medeiros tarafından yapılmıştır. Nükleotid dizilerine dayalı moleküler düzeydeki sınıflamanın ilk temellerini ise 1980 yılında Ambler yapmıştır (Tablo-II) (9, 28, 49, 72).

Tablo-I:Antibiyotiklerin kullanıma girmesi ve beta laktamaz üretimi (8, 49)

Antibiyotik dönemi	Antibiyotik	Ortaya çıkan beta laktamaz	Üreten mikroorganizma
Penisilin dönemi (1940-1960)	Penisilin G	Penisilinaz	<i>S.aureus</i> <i>E.faecalis</i>
Geniş spektrumlu penisilinler ve sefalosporinler (1960-1978)	Metisilin Oksasilin Ampisilin Sefalotin Karbenisilin Sefazolin	AmpC sefalosporinazlar Geniş spektrumlu beta laktamazlar	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>
Sefamisinler 3. kuşak sefalosporinler Aztreonam (1978-1986)	Sefoksitin Sefotaksim Piperasilin Sefaperazon Sefuroksim Seftriakson Seftazidim Aztreonam	GSBL (1983-Almanya)	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>
Karbapenemler (1985)	İmipenem	Metallo beta laktamazlar Karbapenemaz	<i>S. maltophilia</i> <i>S. marcescens</i>
(1984-1993)	Amoksisilin/klavulonat Tikarsilin/klavulonat Ampisilin/sulbaktam Piperasilin/tazobaktam	İnhibitör dirençli beta laktamazlar	<i>K.pneumoniae</i> <i>E.coli</i>

Tablo-II Beta laktamazların sınıflandırılması (9, 28, 72)

Bush Jacoby Medeiros (1995)	Bush (1989)	Ambler (1980)	Richmond Sykes (1968-73)	Tercih edilen substrat	Klavulonik asit etkisi	Örnek enzimler
1	1	C	Ia, Ib, Id	Sefalosporinler	-	Gram negatif bakterilerdeki AmpC enzimleri MIR-1
2a	2a	A	-	Penisilinler	+	Gram pozitif bakterilerdeki penisilinazlar
2b	2b	A	III	Penisilinler Sefalosporinler	+	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	2b'	A	-	Penisilinler Dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler Monobaktamlar	+	TEM 3-26 SHV 2-6 <i>K.oxytoca</i> K1
2br	-	A	-	Penisilinler	+ -	TEM 30-36 TRC-1
2c	2c	A	II, V	Penisilinler Karbonisilin	+	PSE-1 PSE-3 PSE-4
2d	2d	D	V	Penisilinler Kloksasilin	+ -	OXA 1-11 PSE-2
2e	2e	A	Ic	Sefalosporinler	+	İndüklenebilir sefalosporinazlar (<i>Proteus vulgaris</i>)
2f	-	A	-	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	+	Sme-1 (<i>Serratia marcescens</i>)
3	3	B	-	Karbapenemler dahil bir çok beta laktam	-	L1 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)
4	4	-	-	Penisilinler	-	Penisilinaz (<i>Pseudomonas cepacia</i>)

Grup 1 (Ambler C Sınıfı) Beta Laktamazlar

Bu gruptaki enzimler beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidir ve çoğunlukla kromozomal genler tarafından kodlanırlar. Kromozomal olarak kodlanan enzimlerin sentezi, bakteri beta laktam antibiyotikle karşılaştığı zaman çok fazla artabilir. Bu tür enzimlere indüklenebilen beta laktamazlar da denmektedir. Birinci grup enzimler daha sık *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa*' da bulunmaktadır (26, 74, 77, 82).

Grup 2 (Ambler A Sınıfı) Beta Laktamazlar

Bu gruptaki enzimler plazmid tarafından taşınan genler tarafından kodlanmaktadır. Plazmidler bakteriden bakteriye geçebildikleri için, bu tip enzimler yayılabilmektedir. Grup 2 enzimler klavulonik asit, sulbaktam, tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri tarafından etkisiz hale getirilebilir. İlk saptanan Grup 2 enzimleri ampisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere etkili iken, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere etkisizdi. Ancak zamanla bu enzimlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu monobaktam ve üçüncü kuşak sefalosporinlere de etkili olan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ortaya çıkmıştır (77, 82).

Grup 3 (Ambler B Sınıfı) Beta Laktamazlar

Grup 3 beta laktamazlar karbapenemleri inaktive eden metallo beta laktamazlardır. Aktiviteleri için çinko iyonlarına gereksinimleri vardır ve klavulonik aside direnç gösterirler.

Bu grup enzimler *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis* ve *P.aeruginosa*'da bulunmaktadır (77, 82).

Grup 4 Beta Laktamazlar

Diğer gruplara dahil edilemeyen *Burkholderia cepacia*'nın penisilinazı gibi enzimleri içerirler (77, 82).

Beta Laktamazların İsimlendirilmesi

Beta laktamazların isimlendirilmesindeki farklı yaklaşımlar, bu enzimleri gördüklerinden daha fazla karmaşık bir hale getirmiştir. Bazı enzimler tercih ettikleri substratlara göre (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine göre (SHV, NBC), genlerine göre (*Amp-C*, *CepA*), izole edildikleri bakterilere göre (AER, PSE), suşlara göre (P99), izole edildikleri hasta isimlerine göre (TEM, ROB), izole edildikleri hastaneye ve eyaletlere göre ya da bulan kişilere göre isim almışlardır. Bunlardan bazıları geçerliliklerini yitirmiştir. Örneğin, SHV, sülfidril variabil' dan kısaltılmıştır, buna karşın artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril değil, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde, ilk kez *Pseudomonas*'dan izole edilmiş olan PSE enziminin artık enterobakterilerde de bulunabildiği bilinmektedir. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan TEM enziminden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitor rezistan) gibi tanımlayıcı isimler verilmiş ve bu da bir karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise ,TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM 26, TEM 43 gibi numara ile belirtilmesidir (10, 28, 44, 72).

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZLAR

GENEL ÖZELLİKLERİ

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), sefamisinler hariç tüm sefalosporinleri, penisilinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen enzimlerdir. Aktif bölgelerinde serin içermektedirler. Grup 2b'de yer alan ve penisilin türevleri ile dar spektrumlu sefalosporinleri parçalayan enzimlere göre daha geniş spektrumlu oldukları için bu şekilde adlandırılmaktadırlar (2, 6, 49)

Bu enzimler, Ambler'in moleküler sınıflamasında grup A veya grup D içinde, Bush-Jacoby-Medeiros grup 2be ve 2d'de yer almaktadır. GSBL'ler klavulonik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Sefamisinler ve karbapenemler GSBL'lerden etkilenmezler. Bu enzimler çoğunlukla bakteri suşları ve türleri arasında geçebilen büyük plazmidlerde kodlanmaktadır (2, 6, 29).

GSBL'ler başta *K.pneumoniae* olmak üzere, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *P.aeruginosa*, *B.cepacia* gibi birçok Gram negatif bakteride bulunabilmektedir (6, 29, 59, 73).

GSBL'lerin aktif bölgelerinde köken aldıkları enzimlerden 1-7 aminoasitte değişiklik bulunmaktadır. En önemli değişiklikler spektrumu genişletenlerdir. Bunlar aktif bölgeyi genişleterek enzimin oksiminin yan zincirini içeren beta laktamlar ile etkileşime girmesini

sağlamaktadır. Sonuçta GSBL'ler köken aldıkları TEM-1, TEM-2, SHV-1 enzimlerinden farklı olarak, oksimino grubu içeren beta laktamları (seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim ve aztreonam) hidroliz edebilmektedir. Bazı aminoasit değişiklikleri de GSBL'lere farklı substrat özgüllüğü sağlamaktadır (29).

GSBL Tipleri

Son yıllarda beta laktamazlarının sayısının hızla arttığı ve klinik açıdan önemli yeni enzim tipleri tanımlandığı görülmektedir. Günümüzde TEM türevi beta laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta laktamazların sayısı 60'ı geçmiştir (29).

GSBL'ler iki gruba ayrılabilir.

1-TEM ve SHV türevleri

2-TEM ve SHV dışı GSBL'ler

TEM ve SHV türevi enzimler, TEM-1, TEM-2, SHV-1 gibi enzimlerden nokta mutasyonu ile köken almış, geniş spektrumlu beta laktamları hidrolize edebilen enzimlerdir (2, 6, 72).

TEM Grubu

TEM-1 Gram negatif bakterilerde en sık bulunan enzimdir ve ampisiline dirençli *Escherichia coli*'lerin %90'ında dirençten bu sorumludur. TEM-1 ve onun kimyasal benzeri TEM-2 enzimleri dar spektrumlu enzimlerdir; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilir ancak oksimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur. GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir. O günden başlayarak TEM

grubu beta laktamazların sayı ve çeşidinde büyük bir artış gözlenmiştir. TEM enziminde oluşan aminoasit değişiklikleri sonucunda GSBL'lerin fenotiplerinde önemli değişiklikler olmakta, örneğin belirli oksiminino-sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri veya izoelektrik noktaları değişebilmektedir (2, 6, 29, 71).

TEM grubu beta laktamazlar, *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *M.morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sık bulunmaktadır ve daha nadir olarak *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir (2, 6, 29, 71).

SHV Grubu

SHV grubu enzimlerin öncüsü olan SHV-1 enzimi en sık *K.pneumoniae*'da bulunmaktadır ve bu türde plazmid kökenli ampisilin direncinin %20'sine neden olmaktadır. SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türevi 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. SHV grubu enzimler *K.pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da bildirilmiştir (2, 6, 29, 71).

CTX-M Grubu

Son yıllarda GSBL'lerin arasına yeni bir grup katılmıştır. CTX-M olarak tanımlanan bu grup beta laktamazlar substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir. Seftazidimi bir miktar hidroliz etmekle birlikte klinikte dirence yol açacak kadar önemli değildir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği de bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulonik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır (2, 6, 29, 71).

İlk CTX-M beta laktamaz 1989 yılında Almanya’da *E.coli*’de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere bir çok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmış ve 1995 yılından itibaren büyük bir artış göstermiştir. Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır. CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2 bu grupta en yaygın olan enzimlerdir. Bu enzimler hem insanlarda hem de sağlıklı hayvanlarda izole edilmişlerdir. Yayılımları hem plazmid hem de hareketli genetik elementlere bağlıdır. CTX-M enzimleri çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmalarda bulunmaktadır, ancak SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir (2, 6, 29, 71).

OXA Grubu

OXA grubu enzimler Ambler grup D’de yer alan ve daha çok *P.aeruginosa*’da bulunan GSBL’lerdir. Bu enzimlerin OXA-1’den OXA-10’a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir. TEM ve SHV türevlerinde olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (6, 29).

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Türkiye’de izole edilen bir *P.aeruginosa* suşunda bulunmuştur. Daha sonra yine dünyada ilk kez OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17 beta laktamazları Türkiye’de izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında tanımlanmıştır (6, 29). Bu enzim genlerinin çoğunluğu plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir. OXA enzimleri içinde OXA-20, OXA-23, OXA-24 gibi yeni

tanımlanan enzimler karbapenemaz aktivitesi göstermektedir, bunlar GSBL değildir (6, 29, 71, 76).

İnhibitörlere Dirençli Beta Laktamazlar

Beta laktamaz inhibitörleri klinikte kullanılmaya başlandıktan sonra 1997 yılından itibaren bazı amoksisilin-klavulonik aside dirençli *E.coli*'ler bildirilmeye başlanmıştır. İnhibitörlere dirençli olan beta laktamazların üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize edememelerine karşın TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için GSBL'lerle birlikte ele alınmaktadırlar. Günümüzde inhibitörlere dirençli enzimlerin (IRT) sayısı 22 civarındadır. IRT'ler en sık olarak *E.coli* de bulunmakla birlikte *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Proteus mirabilis* ve *Citrobacter freundii*'de de bildirilmektedir (6, 12, 29, 77).

Diğer GSBL'ler

Son yıllarda genişlemiş spektrumlu enzimlerden olup TEM, SHV, OXA veya CTX-M beta laktamazlardan köken almamış bazı enzimler bildirilmeye başlanmıştır. Bu enzimlerden biri PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşunda bulunmuş, kromozomal bir enzim olarak bildirilmiştir. Kısa bir süre sonra Türkiye'de 14 *P.aeruginosa* suşunda bulunan GSBL'nin PER-1 olduğu belirlenmiş ve ilk kez plazmid kontrolünde olduğu gösterilmiştir. Daha sonra İstanbul'da *Salmonella spp*'lerde de gösterilmiştir. PER-1 enzimi içeren *P.aeruginosa*'nın en belirgin özellikleri, izolatların seftazidime çok dirençli olmasına karşın piperasilin için daha düşük bir direnç göstermesidir. Bu enzimler klavulonik asit ve tazobaktama duyarlıdır. VEB-1 enzimi

ilk kez Vietnam’da bir *E.coli* suşundan daha sonra Tayland’da bir *P.aeruginosa* suşundan elde edilmiştir(6, 29). CME-1 enzimi bir *Chryseobacterium meningosepticum* suşundan, TLA-1 bir *E.coli* suşundan elde edilmiştir. PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1 enzimleri %50 homoloji göstermektedir ve oksimino-sefalosporinlere özellikle seftazidime ve aztreonama etkilidirler (6, 13, 29, 80).

GSBL’lerin Tanı Yöntemleri

GSBL üreten etkenlerle infekte hastalara geniş spektrumlu beta laktam ajanların uygulanması genel olarak tedavi başarısızlığıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu tip enzimleri saptamak için geliştirilmiş standart tarama ve doğrulama testlerini uygulaması ve sonuçları doğru yorumlaması gerekmektedir (2).

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI=eski NCCLS), GSBL üreten suşların rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde sefalosporinlere duyarlı görünseler bile bütün sefalosporinler, penisilinler ve aztreonama dirençli olarak bildirilmesini önermektedir. Yanlış GSBL pozitif bildirimler, günümüzde en etkili ve en önemli tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı direnç gelişimine, maliyet artışına, aynı zamanda yanlış negatif bildirimler ise tedavi başarısızlığına yol açacaktır (14, 31).

GSBL’si bulunan ve bulunmayan bakterilerle gelişen infeksiyonlar mortalite, morbidite ve sağlık giderleri açısından karşılaştırıldığında, ilk tedavi olarak karbapenemlerin kullanıldığı hastalar hariç GSBL üreten suşlarla gelişen infeksiyonlarda mortalitenin daha yüksek, yatış süresinin daha uzun ve sağlık giderlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (71).

Rutin laboratuvarlar için tanımlanmış GSBL saptama yöntemleri, tarama ve doğrulama testleri olarak iki kısımda incelenebilir. Bunlar dışında GSBL tiplerinin belirlenmesi için araştırma laboratuvarlarında uygulanan tanımlama yöntemleri de bulunmaktadır (45, 71).

GSBL Tarama Testleri

CLSI, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* izolatlarında GSBL üretiminin taranması ve doğrulanması için standartlar geliştirmiştir. CLSI önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanmalıdır. İnhibisyon zonlarının daraldığı veya MİK değerlerinin yükseldiği durumlarda doğrulama testleri yapılmaktadır. GSBL tarama testinde antibiyotik zon çapları ve minimum inhibitör konsantrasyonları tablo-III'te sunulmuştur (14).

Tablo-III: GSBL tarama testleri (14)

Antibiyotik	İnhibisyon zonu(mm)	MİK(µg/ml)
Sefotaksim	≤27	≥2
Seftriakson	≤25	≥2
Seftazidim	≤22	≥2
Sefpodoksime	≤17	≥2
Aztreonam	≤27	≥2

GSBL Doğrulama Testleri

Fenotipik doğrulama testleri klavulonik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler, GSBL'leri beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen Amp-C tipi enzimlerden ayırt etmektedir.

Doğrulama amacıyla değişik yöntemler tanımlanmıştır. Bunlar; klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı, çift disk sinerji yöntemi, üç boyutlu yöntem, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi, minimum inhibitör konsantrasyon'unun (MİK) saptandığı dilüsyon yöntemleri, E-test stripleri ile MİK' in saptanması gibi yöntemlerdir (6, 14, 71).

Klavulonik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı:

Klavulonik asit içeren diskler ticari olarak bulunmakta ya da CLSI önerilerine göre laboratuvarında hazırlanabilmektedir. Bu amaçla klavulonik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse, izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (14,23, 71).

Çift disk sinerji yöntemi:

Bu yöntemde test edilecek izolat agar disk difüzyon kurallarına göre agar yüzeyine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin klavulonik asit(AMC) diski ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam veya sefpodoksim diskleri yerleştirilir. İnkübasyondan sonra sefalosporin veya

aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakteri üremeyen bir sinerji alanının bulunması, GSBL varlığını gösterir (6, 36, 71).

Kromozomal ve indüklenebilir Amp-C enzimi üreten türlerde, doğrulama testleri ile ilgili güçlükler bulunmaktadır (58, 78). Klavulonik asit Amp-C tipi beta laktamazları indüklediği için, klavulonik asit yanındaki beta laktamazın etkinliğini arttırmak yerine azaltmaktadır. Bu durumda GSBL varlığına bağımlı sinerji ortadan kalkmaktadır. Sulbaktam ve tazobaktam gibi sülfonlarla indüksiyon olmadığı için, Amp-C üreten türlerde klavulonik asit yerine bu ajanlar kullanılabilir. Sefepim, üçüncü kuşak sefalosporinlere kıyasla Amp-C tipi beta laktamazlardan minimal düzeyde etkilendiği için bu tip enzimleri üreten suşlarda GSBL saptanmasında daha güvenlidir. Yine Amp-C tipi beta laktamaz üreten suşlarda sefoksitine direnç görülmesi GSBL ayırımında kullanılabilecek bir parametredir (78).

Sulandırım yöntemleri:

GSBL üretiminin belirlenmesi amacıyla, beta laktamaz inhibitörleri varlığında sefalosporin direnç düzeylerindeki azalmanın gösterilmesi için ayrıca standart mikrodilüsyon yöntemi de kullanılabilir. Bu durumda sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başlarına, hem de klavulonik asit (4µg/ml) varlığında saptanır. Klavulonik asit varlığında MİK değerlerinde $\geq 3 \log_2$ (8 kat) azalma, GSBL göstergesi olarak kabul edilir (6, 14, 71).

GSBL E-test stripleri

Klavulonik asit varlığında MİK değerlerinde azalmayı gösteren diğer bir yöntem de GSBL E-test stripleridir. Stripler bir ucunda seftazidim, diğer ucunda seftazidim ve

klavulonik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır. Seftazidim/sefotaksim ve seftazidim/sefotaksim-klavulonik asit MİK değerleri birbiriyle oranlandığında MİK değerinde sekiz kat azalma olması GSBL varlığını gösterir (6, 71).

Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler enzimlerin tanımlanmasında araştırma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, DNA problemleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), oligotiplendirme, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), izoelektrik odaklama ve nükleik asit dizi analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Enzimin kesin olarak tanımlanması bu konuda altın standart yöntem olarak kabul edilen nükleik asit dizi analizi ile mümkün olmaktadır. Bu yöntemle farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilmektedir (6, 71).

GSBL'lerin Epidemiyolojik Özellikleri

GSBL enzimleri tüm dünyada hastane infeksiyonlarında önemli bir problem haline gelmiştir ve ayaktan tedavi edilen hastalarda da görülme sıklığı artmaya başlanmıştır. GSBL prevalansı özellikle genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin klinik tedaviye girme zamanı ve yaygın kullanımı ile ilişkili olduğu için GSBL üreten suş sayısı ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye hatta aynı hastanedeki servisler arasında değişmektedir (53, 56, 71).

GSBL üreten bakteri ilk olarak 1983 yılında Almanya'dan, ilk hastane kaynaklı salgın da 1985 yılında Fransa'dan bildirilmiştir. Daha sonra Amerika Birleşik

Devletleri'nden ve tüm dünyadan GSBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonlar ve salgınlar rapor edilmiştir (6).

GSBL *Enterobacteriaceae* üyelerinin bir çoğunda görülse de en sık *K.pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *E.coli*' de saptanır (6, 56, 71)

Klebsiella türleri kapsülleri olması nedeniyle kuruluğa daha dirençlidirler, cilt ve eşyalar üzerinde uzun süre kalarak çapraz infeksiyonlara neden olabilirler. Bu bakteriler arasında değişik yollarla veya GSBL kodlayan plazmidler aracılığıyla farklı suşlar arasında direnç genleri transfer edilerek yayılabilir (20).

GSBL taşıyan plazmidler 100 kb veya daha büyük plazmidlerdir. GSBL genleri taşıyan genler aynı zamanda aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfonamid direnç genlerini de taşıyabilir. Birçok merkezde bu plazmidlerin veya klonun yayılması ile oluşan GSBL salgınları bildirilmiştir. Bazen bu yayılma o kadar yoğun olabilir ki hastanede yatan hastaların üçte biri GSBL üreten suşlarla infekte veya kolonize olurlar. Salgınlar sırasında GSBL üreten suşlar hastaların alt gastrointestinal sisteminde yoğun bir şekilde kolonize olur ve hastalar arasında sağlık personelinin elleri ile nakledilirler. Bazı salgınlar ise termometre ve ultrason jeli gibi tıbbi araçlar ve gereçler aracılığıyla olmaktadır. GSBL diğer beta laktamazlar ile de birlikte bulunabilir (22, 71).

GSBL üreten mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda bağımsız risk faktörlerini belirlemek için bir çok çalışma yapılmıştır. En sık belirlenmiş olan risk faktörleri uzun süreli hastanede kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma veya daha önceden de hastanede kalma, yabancı materyal ve invaziv girişimler, ileri yaş, malignite, diyabet, kalp hastalığı gibi kronik

hastalıklar ve uzun süreli antibiyotik ve özellikle üçüncü kuşak sefalosporin kullanımıdır (15, 56, 71).

GSBL Üreten Bakterilerle Meydana Gelen İnfeksiyonlarda Tedavi Yaklaşımı

GSBL direnci sonucu beta laktam antibiyotiklerin hidrolize edilmesi, GSBL pozitif mikroorganizmalarda ek olarak aminoglikozid, trimetoprim sulfametoksazol ve kinolonlara karşı görülen direnç de antibiyotik seçimini kısıtlamaktadır. Kısıtlayıcı bir diğer faktör ise mikroorganizmaların GSBL ile birlikte farklı direnç mekanizmalarına da sahip olmasıdır (2).

Üçüncü kuşak sefalosporinler

Üçüncü kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefotaksim, seftriakson) GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili değildir. GSBL pozitif mikroorganizmalar antibiyotik duyarlılık testinde sefalosporinlere duyarlı olsa bile, bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonlarda üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılmamalıdır (52, 71).

Dördüncü kuşak sefalosporinler

Sefepim özellikle SHV türü bir çok GSBL'ye in vitro etkilidir. Bununla birlikte bakteri inokulumunun arttırılması ile sefepim duyarlılığında azalma görülebilir. GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda sefepim kullanımı sonucu tedavi başarısızlığı veya GSBL pozitif suşların seleksiyonu görülebilir. GSBL pozitif mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlarda kullanılması önerilmemektedir (2, 52, 71, 80)

Sefamisinler

Sefoksitin ve sefotetan diğer sefalosporinlere göre GSBL'lerden daha az etkilenirler ve *in vitro* olarak bu antibiyotiklere duyarlıdırlar. Bununla birlikte GSBL pozitif mikroorganizmalarla oluşan ciddi infeksiyonlarda tedavi sırasında porin mutasyonuna bağlı hızla direnç gelişmesi nedeniyle tedavi başarısızlığı görülebilir. Ülkemizde yakın zamana kadar kullanımda olan sefoksitin artık kullanımda değildir (2, 52, 71).

Beta laktam/beta laktamaz inhibitörleri

GSBL'ler genellikle, klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile inhibe olurlar. *In vitro* ve *in vivo* yapılan çalışmalarda beta laktam/beta laktamaz inhibitörlerinin GSBL pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Mikroorganizmalarda yüksek oranda yapılan beta laktamaz enzimi, diğer beta laktamazların özellikle inhibitor dirençli beta laktamazların yapılması veya porin defekti olması gibi durumlarda etkisiz kalabilirler. AmpC indüklenebilir beta laktamazlara beta laktamaz inhibitörleri etkili değildir. Klavulonik asit beta laktamaz indüksiyonuna neden olabilir. Ciddi sistemik infeksiyonlarda beta laktam/beta laktamaz inhibitor kombinasyonlarının aminoglikozidlerle birlikte kullanılması tedavi başarısını arttırabilir (2, 52, 71).

Aminoglikozidler

Aminoglikozidler GSBL pozitif mikroorganizmalarla oluşabilen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Bununla birlikte GSBL taşıyan plazmidler aminoglikozid direnç

genlerini de taşıyabilirler. GSBL pozitif suşlar sıklıkla aminoglikozidlere de dirençlidirler (52, 71).

Kinolonlar

Kinolonlar, GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerdir. Bununla birlikte GSBL direnci ve kinolon direncinin birlikte görülme sıklığı artmaktadır. GSBL pozitif suşlarda %10-40 arasında değişen kinolon direncinin görülmesi, kinolonların kullanımını kısıtlamaktadır (52, 71).

Karbapenemler

İmipenem ve meropenem GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonların tedavisinde ilk seçenek antibiyotiklerdir. Tedavide tek başına kullanılabilirler (52, 71).

GSBL Direncinin Sınırlandırılması

GSBL üreten bakterilerin oluşturduğu infeksiyonların kontrol altına alınması için süveyans programlarının uygulanması, antibiyotik kullanımının denetlenmesi ve dirençli suşların hastalar arasında yayılmasının engellenmesi gerekmektedir (2, 6, 40).

Süveyans

Süveyans programları antimikrobiyal duyarlılık oranlarını, çeşitli mikroorganizma topluluklarında direncin artışını, aktarılmasını ve direnç genlerinin ekspresyonunu gözlemek için uygulanırlar. Yapılan çalışmalar, ülkemizde GSBL üretiminin Avrupa ülkeleri arasında en yüksek düzeylere ulaştığını göstermektedir. Bu yüksek düzeydeki direnç sorunun kontrol

edilebilmesi için sağlık kurumları kendi imkanlarının izin verdiği ölçüde teknik alt yapı oluşturmak zorundadır. Sağlık kurumları kendilerine en uygun GSBL saptama yöntemini uygulamalıdır (71).

Antibiyotik Kullanımının Kontrolü

Uygun olmayan dozlarda ve kısa süreli ya da aralıklı antibiyotik kullanımı dirençli mikroorganizmaların artmasına neden olmaktadır. Dirençli mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların mortalitesi yüksektir ve hastanede yatış süresini uzatarak tedavi maliyetinin de yükselmesine yol açarlar. Yapılan çalışmalarda geniş spektrumlu sefalosporinlerin özellikle seftazidimin yaygın kullanımı dirençli suşların seleksiyonuna ve GSBL yayılımına neden olmaktadır. Ampirik antibiyotik tedavilerinde üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının kısıtlanmasının GSBL üreten mikroorganizma sayısında azalmaya neden olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Ancak seftazidim kullanımının kısıtlandığı durumlarda tazobaktam/piperasilin gibi beta laktam/beta laktamaz kombinasyonları ve GSBL üreten mikroorganizmalarda ilk seçenek olan karbapenemlere karşı direnç oranlarının artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle antibiyotik kullanım politikaları değiştirilmeden önce iyice düşünölmeli ve etkileri dikkatlice hesaplanmalıdır (2, 71)

İzolasyon Önlemleri

İzolasyon ve bariyer önlemleri GSBL üreten mikroorganizmaların yayılmasını sınırlamada ve salgınların kontrolünde önemli yer işgal etmektedir.

Amerika Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) GSBL üreten bakterilerinde içinde bulunduğu çoklu dirençli mikroorganizmalar için bu konuda önerilerde bulunmuştur (71).

GSBL üreten mikroorganizmalarla infekte veya kolonize hastalar için temas kontrol önlemleri (71)

1-Kayıt sistemi

Hastaya ait tıbbi kayıtlara ve yatak başı kartlarına GSBL uyarısı eklenmelidir.

2-Eğitim

Hastaların, hastane personelinin ve ziyaretçilerin, korunma önlemleri ve uygulamaları konusunda eğitilmeleri gerekmektedir.

3-Temas önlemleri

GSBL üreten suşlarla infekte hastalarla mümkünse diğer hastalarla ilgilenildikten sonra ilgilenilmelidir.

Hastayla temastan önce ve sonra eller dezenfektan ile temizlenmelidir.

Hastaya dokunurken veya ilgilenirken koruyucu önlük ve eldiven kullanılmalıdır.

İmha edilmeden önce tüm klinik materyal ayrı bir bölmede muhafaza edilmelidir.

Eller yıkanmadan, koruyucu giysiler değiştirilmeden hastadan hastaya geçiş yapılmamalıdır.

Eğer mümkünse GSBL üreten mikroorganizmalarla infekte ve kolonize hastalar için ayrı tıbbi cihazlar kullanılmalıdır veya diğer hastalar için kullanmadan önce dezenfekte edilmelidir.

4-Diğer bölümlere ve hastanelere nakil durumlarında yapılması gerekenler

Mümkün olduğunca hasta nakilleri ve hareketleri önlenilmelidir. Nakil gerekliyse hastayı kabul edecek bölüm çapraz kontaminasyonu en aza indirmek amacıyla gerekli önlemleri alması için uyarılmalıdır. Eğer mümkünse hasta en kısa sürede taburcu edilmelidir.

5-Hastanın yerleşimi

Eğer şartlar uygunsa hasta tek kişilik odaya yerleştirilmelidir yada aynı mikroorganizma ile meydana gelen aktif enfeksiyonlu hastalar aynı odaya yerleştirilmelidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

1-Kullanılan antibiyotikler

Disk difüzyon testlerinde kullanılanlar

Aztreonam (ATM)-30µg (Bioanalyse, Türkiye)

Seftazidim (CAZ)-30 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Sefotaksim (CTX)-30 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Seftriakson (CRO)-30 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Sefepim (FEP)-30 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Sefoksitin (FOX)-30 µg (Oxoid, İngiltere)

Amoksisilin/klavulonat (AMC)-10/20µg (Bioanalyse, Türkiye)

Dilüsyon testlerinde kullanılanlar

Seftazidim (CAZ)-(GlaxoSmithKline, İngiltere)

Sefotaksim (CTX)-(Eczacıbaşı, Türkiye)

Klavulonik asit (CA)-(Deva, Türkiye)

2-Besiyerleri

Eosin Metilen Blue Agar (EMB) (Biolab, Macaristan)

Mueller-Hinton Agar (Biolab, Macaristan)

Mueller-Hinton Broth-II (Lab M, Birleşik Krallık)

TSI (Three Sugar Iron) Agar (Biolab, Macaristan)

Simmon's Sitrat Agar (Biolab, Macaristan)

Triptofan sıvı besiyeri (Biolab, Macaristan)

Üre agar (Biolab, Macaristan)

Mio besiyeri (Difco, Fransa)

3-Kitler

API 20E (Biomerieux, Fransa)

4-Cihazlar

Otoklav (Hirayama, Japonya)

Etüv (Dedeoğlu, Türkiye)

Derin dondurucu (Sanyo, Japonya)

YÖNTEM

Bakterilerin Seçilmesi ve Tanımlanması

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında, ayaktan ve yatarak tedavi olan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden elde edilen 386 adet *Enterobacteriaceae* suşu incelenmeye alınmıştır.

Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* suşları TSI agar, üre agar, Mio, indol ve sitrat besiyerlerindeki reaksiyonlarına göre tanımlanmıştır (30). Yine gerekli olan durumlarda API 20E (Biomereux, France) otomatik tanımlama kiti kullanılmıştır.

GSBL Saptamak İçin Tarama Testi

Seçilen *Enterobacteriaceae* suşlarında CLSI M100-S16 (2006) önerilerine uygun olarak genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığının araştırılması için tarama testi yapılmıştır.

Çalışmaya alınan suşların 0.5 Mc Farland eşeline uygun olarak serum fizyolojik içinde süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyon Mueller Hinton Agar yüzeyine yayılmıştır. Agar yüzeyine seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg) ve aztreonam (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 18-24 saat 35 °C’de inkübe edildikten sonra antibiyotiklere ait inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. CLSI önerilerine göre inhibisyon zon çapının seftriakson için ≤ 25 mm, sefotaksim ve aztreonam için ≤ 27 mm, seftazidim için ≤ 22 mm olması durumunda tarama testi olumlu olarak kabul edilmiştir (14).

Antibiyotiklerinden herhangi birine karşı duyarlılığının azaldığı saptanan 100 adet bakteri suşu doğrulama testlerinin yapılması amacıyla çalışmaya alınmıştır.

GSBL Saptanmasında Kullanılan Doğrulama Testleri

CLSI tarama testi önerilerine göre seçilen 100 bakteri suşuna aşağıdaki doğrulama yöntemleri uygulanmıştır (Şekil-1).

1-Çift disk sinerji testi

2- Üç boyutlu yöntem

3- Spot(nokta) inokulasyon testi

4-Inhibitör ile güçlendirilmiş disk difüzyon testi

5-Sefotaksim/klavulonik asit ve seftazidim/klavulonik asit kombine disk difüzyon testi

6-Mikrodilüsyon yöntemi

1-Çift disk sinerji testi:

CLSI önerilerine göre disk difüzyon yönteminin standartlarına uygun olarak 0.5 Mc Farland eşeline göre bulanıklığı ayarlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agarı yüzeyine yayıldıktan sonra merkeze amoksisilin-klavulonik asit (10+20µg) diski yerleştirilerek, çevreye merkezden uzaklığı 30 mm olacak şekilde seftazidim(30µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30µg), sefepim (30µg) ve aztreonam (30µg) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 18-24 saat 35°C’de inkübe edilmiştir. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının inhibitör diskine doğru genişlemeleri veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri

üreyen alanda üremenin olmadığı bir bölgenin görülmesi GSBL olumluluğu olarak yorumlanmıştır (Şekil 2-5) (36, 57).

Antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zon çapının azaldığı ve sıfır olduğu durumlarda diskler merkezden 25 mm, 20 mm ve 15 mm uzaklığa yerleştirilmiş ve test tekrarlanmıştır. İndüklenebilir AmpC beta laktamaz ayrımının yapılabilmesi amacıyla antibiyotik duyarlılık testine sefoksitin (30 µg) diski eklenmiştir. Sefoksitine dirençli suşların kromozomal AmpC beta laktamaz ürettiği düşünülmüştür (56, 71, 78).

2-Üç boyutlu yöntem:

Bu yöntemde GSBL varlığını saptamak için seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefepim (30 µg) ve aztreonam (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşundan 0.5 Mc Farland eşeline göre bulanıklığı ayarlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar yüzeyine yayılmıştır. Agarın merkezine test edilecek antibiyotik disklerinden bir tanesi yerleştirilmiştir. Antibiyotik diskinden 5 mm uzaktan başlayarak steril bir bisturi ile dış tarafa doğru besiyeri çizgi şeklinde kesilmiştir. Test edilecek izolatın sekiz-on kolonisi steril öze yardımı ile toplanmış ve daha sonra öze ile kesilen çizginin içine batırılıp diskten dışarıya doğru ekim yapılmıştır. On sekiz-yirmi dört saat 35°C'de inkübasyondan sonra inhibisyon zonunda düzensizlik görülmesi GSBL olumluluğu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6-7) (64).

3-Nokta (Spot) inokulasyon testi:

Escherichia coli ATCC 25922 suşundan 0.5 Mc Farland eşeline göre hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar yüzeyine yayılmıştır. Agarın merkezine test edilecek antibiyotik (seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefepim (30 µg) ve aztreonam (30 µg)) disklerinden bir tanesi yerleştirilmiştir ve test bütün antibiyotikler için ayrı plaklarda tekrarlanmıştır. Test edilecek izolatın beş-altı kolonisi steril öze ile toplanarak antibiyotik diskinden 7-8 mm uzağa nokta şeklinde ekilmiştir. Bir gece 35°C’de inkübasyondan sonra antibiyotik inhibisyon zonunda düzensizlik görülmesi GSBL olumluluğu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 8-9) (64).

4-İnhibitör ile güçlendirilmiş disk difüzyon testi:

Genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin klavulonik asit ile sinerji gösterip göstermediklerinin belirlenmesi amacıyla deney uygulanmıştır. Standart disk difüzyon yöntemi için kullanılacak Mueller Hinton agar içine 4 µg/ml klavulonik asit eklenmiştir. Klavulonik asit, Mueller Hinton agar 50°C’ye soğutulduktan sonra eklenmiştir ve birkaç gün içinde hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. Seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefepim (30 µg) ve aztreonam (30 µg) diskleri, klavulonik asit içeren ve içermeyen Mueller Hinton agara, 0.5 Mc Farland eşeline göre ayarlanmış bakteri süspansiyonları yayıldıktan sonra yerleştirilmiştir. Plaklar bir gece 35°C’de inkube edildikten sonra antibiyotik inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Antibiyotiklerin herhangi birinde, klavulonik asit içermeyen Mueller Hinton agarda saptanan zon çapına göre, klavulonik asit içeren

Mueller Hinton agardaki zon çapında 10 mm ve üstü artış meydana gelmesi durumunda bakteride GSBL üretiminin olumlu olduğu kabul edilmiştir (şekil 10-11) (32).

5-Sefotaksim/klavulonik asit ve seftazidim/klavulonik asit kombine disk difüzyon testi:

Testte ticari olarak bulunan sefotaksim/klavulonik asit (30g/10g) ve seftazidim/klavulonik asit (30g/10g) kombine diskleri kullanılmıştır. 0.5 Mc Farland eşeline uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu yayılan Mueller Hinton agar plaklarına klavulonik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilmiştir. Bir gece 35°C’de inkübasyondan sonra klavulonik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonuna kıyasla 5 mm veya daha genişse, izolat GSBL retimi açısından olumlu kabul edilmiştir (şekil 12-13) (14).

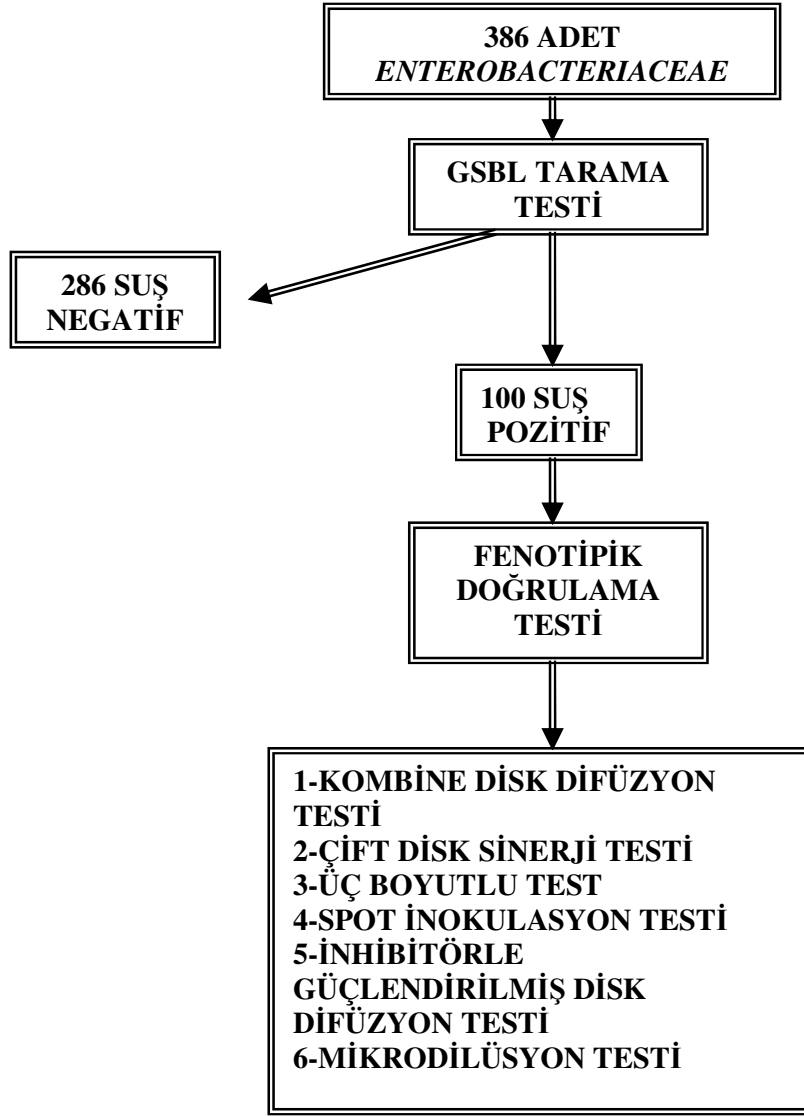
6-Mikrodilüsyon yöntemi:

GSBL üretiminin belirlenmesi amacıyla, beta laktamaz inhibitörleri varlığında sefalosporin direnç düzeylerindeki azalmanın gösterilmesi için ayrıca standart mikrodilüsyon yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntemde sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başlarına kullanılarak hem de 4 g/ml klavulonik asit varlığında saptanmıştır. Antibiyotiklerin MİK değerleri katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyerinde test edilmiştir. U tabanlı mikrodilüsyon plaklarına ilk kuyucuklar (en soldaki sıra) dışındaki her kuyucuğa otomatik pipet ile 100 l Mueller Hinton sıvı besiyeri eklenmiştir. Daha sonra ilk

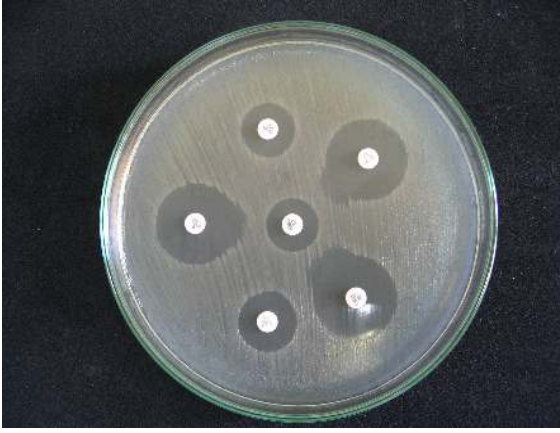
kuyucuklara 100 µl antibiyotik solüsyonu eklenmiştir. İkinci kuyucuğa 100 µl antibiyotik solüsyonu eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra alınan 100 µl sıvı üçüncü kuyucuğa eklenmiştir. Böylece test edilecek antibiyotiğin çift kat seri dilüsyonları elde edilmiştir. Test edilecek bakteri süspansiyonu Mueller Hinton sıvı besiyerinde 0.5 Mc Farland eşeline göre ayarlandıktan sonra 100 kez sulandırılmıştır. Son aşamada negatif kontrol kuyucuğu hariç olmak üzere tüm kuyucuklara elde edilen bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Böylece her kuyucuktaki inokulum miktarı yaklaşık 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikroplaklar üstleri kapatılarak bir gece 35°C’de inkübe edilmiştir. İnkubasyon süresi sonunda kuyucuklardaki bulanıklık çıplak gözle değerlendirilmiştir. Bulanıklığın gözlenmediği son kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu o suş için MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Klavulonik asit varlığında MİK değerlerinde $3 \log_2$ (8 kat) veya daha fazla azalma, GSBL göstergesi olarak kabul edilmiştir (14, 21).

İstatiksel analiz

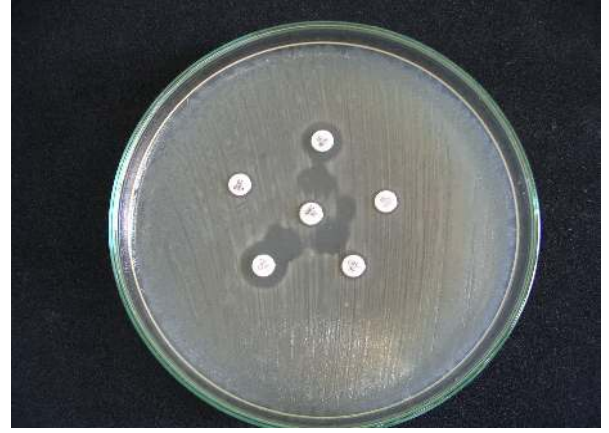
Bu çalışmada, CLSI tarafından önerilen kombine disk difüzyon testi standart fenotipik doğrulama testi olarak alınarak duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değer hesaplamaları SPSS 10 programında yapılmıştır.



Şekil 1: Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* suşlarına uygulanan testler



Şekil 2:Çift disk sinerji testi
(GSBL pozitif)



Şekil 3:Çift disk sinerji testi
(GSBL pozitif)



Şekil 4:Çift disk sinerji testi
(GSBL pozitif)



Şekil 5:Çift disk sinerji testi
(GSBL negatif)



Şekil 6:Üç boyutlu test
(GSBL negatif)



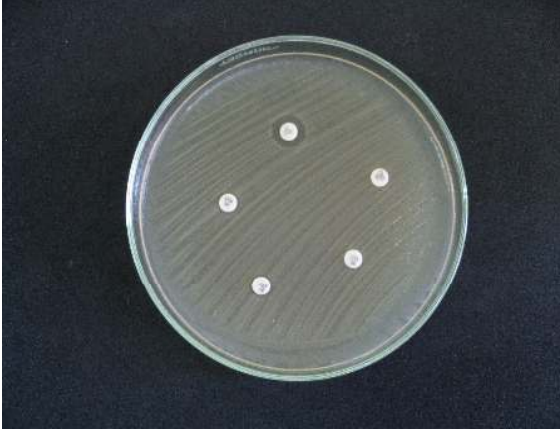
Şekil 7: Üç boyutlu test
(GSBL pozitif)



Şekil 8: Spot inokulasyon testi
(GSBL negatif)



Şekil 9: Spot inokulasyon testi
(GSBL pozitif)



Şekil 10: İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi-Klavulonik asit içermeyen besiyeri (GSBL pozitif)



Şekil 11: İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi-Klavulonik asit içeren besiyeri (GSBL pozitif)



Şekil 12:Kombine disk difüzyon testi (GSBL negatif)



Şekil 13:Kombine disk difüzyon testi (GSBL pozitif)

BULGULAR

Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* (n=386) suşlarının %74.1'i *Escherichia coli*, %12.2'si *Klebsiella pneumoniae*, %2.8'i *Klebsiella oxytoca*, % 2.3'ü *Serratia marcescens*, %1.8'i *Enterobacter aerogenes*, %1.8'i *Enterobacter cloacae*, %1.3'ü *Proteus vulgaris*, %1'i *Proteus mirabilis*, %0.7'si *Morganella morganii*, %0.6'sı *Citrobacter freundii*, %0.3'ü *Serratia rubidaea*, %0.3'ü *Citrobacter youngae*, %0.3'ü *Enterobacter sakazakii*, %0.3'ü *Serratia liquefaciens* ve %0.3'ü *Klebsiella terrigena* olarak tanımlanmıştır.

İncelenen bakterilerin 79.8'i idrar, %5.2'si yara, %5'i kan, %4.2'si balgam, %2.3'ü katater, % 0.8'i pü, %1'i periton, %0.2'si beyin omurilik sıvısı, %0.2'si safra sıvısı ve %0.2'si doku biyopsi kültürlerinden izole edilmiştir. Bakterilerin klinik örneklerle ve türlere göre dağılımı tablo IV'de sunulmuştur.

CLSI önerilerine göre yapılan genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) tarama testine göre seçilen 100 suşa çift disk sinerji, üç boyutlu yöntem, spot inokulasyon, inhibitör ile güçlendirilmiş disk difüzyon, sefotaksim/klavulonik asit ve seftazidim/klavulonik asit kombine disk difüzyon ve mikrodilüsyon fenotipik doğrulama testleri uygulanmıştır. Fenotipik doğrulama testine alınacak GSBL üretimi şüpheli bulunan suşların %69'u *E.coli*, %18'i *K.pneumoniae*, %3'ü *K.oxytoca*, %3'ü *E.cloacae*, %1'i *E.sakazakii*, %1'i *C.youngae*, %1'i *C.freundii*, %1'i *M.morganii*, %1'i *S.marcescens*, %1'i *S.liquefaciens* ve %1'i *Klebsiella terrigena* idi. Tarama testi sonuçlarına göre GSBL üretimi açısından şüpheli bulunan suşların izole edildikleri kaynaklara göre dağılımı tablo V'de sunulmuştur.

Çalışmaya alınan 386 adet *Enterobacteriaceae* suşunun %34.4'ü yatarak, %65.6'sı ayakta tedavi edilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiştir. GSBL üretimi şüpheli bulunan 100 adet *Enterobacteriaceae* suşunun % 41'i ayakta, %59'u yatarak tedavi gören hastalardan izole edilmiştir.

Tablo IV: GSBL tarama testine alınan *Enterobacteriaceae* suşlarının klinik örneklerle ve türlere göre dağılımı

	İdrar	Yara	Kan	Balgam	Katater	Pü	Periton	Diğer*	Toplam/(%)
<i>E.coli</i>	252	10	10	5	4	3	1	1	286 (74.1)
<i>K.pneumoniae</i>	26	1	5	7	3	1	3	1	47 (12.2)
<i>K.oxytoca</i>	7	-	-	2	1	1	-	-	11 (2.8)
<i>S.marcescens</i>	1	4	2	1	-	-	-	1	9 (2.3)
<i>E.cloacae</i>	4	2	-	1	-	-	-	-	7 (1.8)
<i>E.aerogenes</i>	6	1	-	-	-	-	-	-	7 (1.8)
<i>P.vulgaris</i>	3	-	-	-	1	1	-	-	5 (1.3)
<i>P.mirabilis</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	4 (1)
<i>M.morganii</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	3 (0.7)
Diğer #	4	-	2	-	-	1	-	-	7 (2)
Toplam/(%)	310 (80.4)	18 (4.6)	19 (5)	16 (4.2)	9 (2.3)	7 (1.8)	4 (1)	3 (0.7)	386

Diğer :*C.freundii*, *C.youngae*, *E.sakazakii*, *S.rubidaea*, *S.liquefaciens*, *K.terrigena*

*Diğer: Safra sıvısı, doku biyopsi, beyin omurilik sıvısı

TabloV: GSBL tarama testi sonuçlarına göre GSBL üretimi açısından şüpheli bulunan suşların izole edildikleri kaynaklara göre dağılımı

	İdrar	Yara	Kan	Balgam	Katater	Pü	Periton	BOS*	Toplam
<i>E.coli</i>	54	8	1	2	3	1	0	-	69
<i>K.pneumoniae</i>	7	-	4	3	1	-	2	1	18
<i>K.oxytoca</i>	1	-	-	2	-	-	-	-	3
<i>K. terrigena</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>E.cloacae</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	3
<i>E.sakazakii</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>C.youngae</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C.freundii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>M.morganii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S.marcescens</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>S.liquefaciens</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Toplam	67	9	6	9	4	2	2	1	100

*Beyin omurilik sıvısı

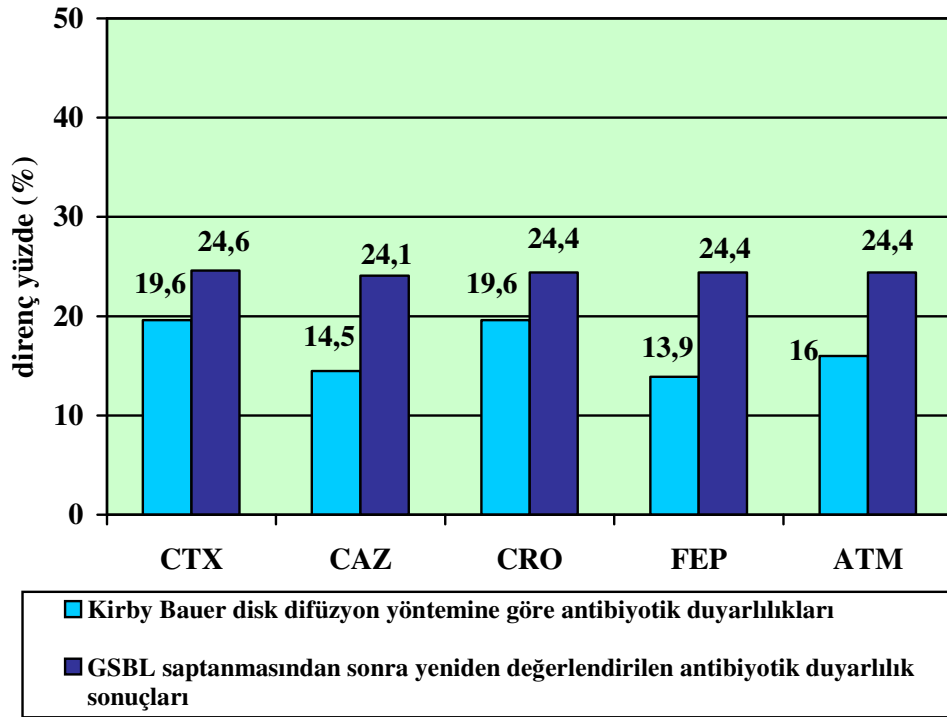
Çalışmaya alınan 386 suşun sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim ve aztreonam duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Test edilen antibiyotiklerden sefotaksime %19.6, seftriaksona %17.6, aztreonama %16, seftazidime %4.5, sefepime %3.9 oranında direnç saptanmıştır. Çalışmaya alınan suşların türlerine göre antibiyotik duyarlılıkları tablo VI'da sunulmuştur.

Tablo VI: Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle saptanan antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

Bakteri (n)	Sefotaksim(%)			Seftazidim(%)			Seftriakson(%)			Sefepim(%)			Aztreonam(%)		
	R*	I*	S*	R*	I*	S*	R*	I*	S*	R*	I*	S*	R*	I*	S*
<i>E.coli</i> (286)	19	4	77	13	2	85	17	3	80	14	2	84	15	4	81
<i>K.pneumoniae</i> (47)	31	4	65	24	4	72	28	8	64	17	8	75	27	8	65
<i>K.oxytoca</i> (11)	9	0	91	0	0	100	9	18	73	18	0	82	18	9	73
<i>S. marcescens</i> (9)	11	0	89	11	0	89	11	0	89	0	11	89	11	0	89
<i>E.cloacae</i> (7)	14	14	72	14	14	72	14	14	72	14	0	86	14	0	86
<i>E. aerogenes</i> (7)	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>P.vulgaris</i> (5)	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>P.mirabilis</i> (4)	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>M.morganii</i> (3)	0	33	67	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>C.freundii</i> (2)	50	0	50	50	0	50	50	0	50	0	0	100	50	0	50
<i>C.youngae</i> (1)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>E.sakazakii</i> (1)	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
<i>S.rubidaea</i> (1)	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
<i>S.liquefaciens</i> (1)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
<i>K.terrigena</i> (1)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0

* R-dirençli I-orta duyarlı S-duyarlı

GSBL saptanmasından sonra CLSI önerilerine göre antibiyotik duyarlılıkları tekrar değerlendirildiğinde sefotaksime %24,6, seftriaksona %24,4, sefepime %24,4, seftazidime %24,1, aztreonama %24,4 oranında direnç saptanmıştır (Şekil 14).



Şekil 14: Çalışmaya alınan 386 *Enterobacteriaceae* suşunun disk difüzyon yöntemiyle saptanan antibiyotik duyarlılıkları

Bu çalışmada fenotipik doğrulama testlerine alınan 100 *Enterobacteriaceae* suşunun 96'sında (%96) çift disk sinerji, 95'inde (%95) üç boyutlu test, 92'sinde (%92) kombine disk difüzyon, 91'inde (%91) hem mikrodilüsyon hem de inhibitör ile güçlendirilmiş disk difüzyon ve 90'ında (%90) spot inokulasyon testiyle GSBL üretimi saptanmıştır.

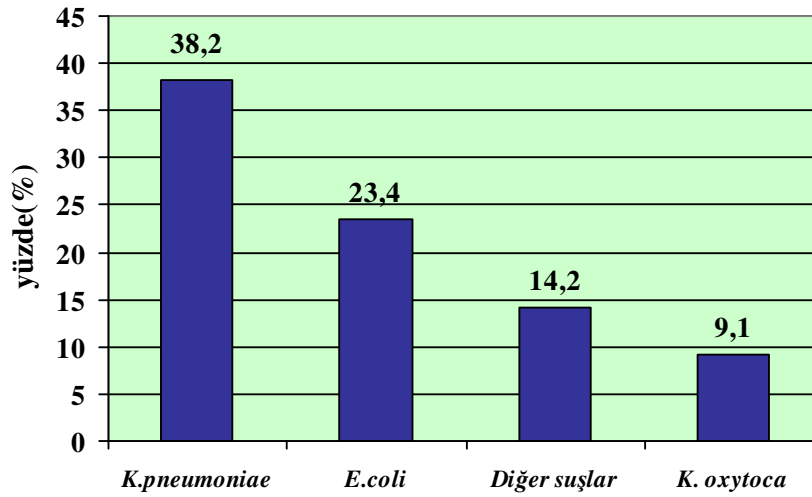
GSBL tarama testi ile seçilen 100 *Enterobacteriaceae* suşunda türlere göre farklı yöntemlerle GSBL saptanma oranları tablo VII’de sunulmuştur.

TabloVII:GSBL tarama testi ile seçilen 100 *Enterobacteriaceae* suşunda farklı yöntemlerle GSBL saptanma oranları, n (%)

Bakteri (n)	Kombine disk difüzyon	Çift disk sinerji	Üç boyutlu test	Spot inokulasyon	İnhibitör ile güçlendirilmiş disk difüzyon	Mikrodilüsyon yöntemi
<i>E.coli</i> (69)	67(97)	69(100)	65(94)	62(90)	67(97)	67(97)
<i>K.pneumoniae</i> (18)	18(100)	18(100)	17(94)	17(94)	18(100)	18(100)
<i>K.oxytoca</i> (3)	1(33)	1(33)	3(100)	2(66)	1(33)	1(33)
<i>K. terrigena</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>E.cloacae</i> (3)	1(33)	1(33)	3(100)	2(66)	1(33)	1(33)
<i>E.sakazakii</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>C.youngae</i> (1)	0(0)	0(0)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>C.freundii</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>M.morganii</i> (1)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>S.marcescens</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>S.liquefaciens</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
Toplam(100)	92(92)	96(96)	95(95)	90(90)	91(91)	91(91)

CLSI'nin standart fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine disk difüzyon testi ile olumlu bulunan suşların GSBL ürettiği kabul edilmiştir. Bu teste göre çalışmaya alınan 386 *Enterobacteriaceae* suşunun %23.8'inde GSBL üretimi saptanmıştır *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca* ve bunlar dışında kalan suşlarda GSBL üretim oranları şekil 15'de sunulmuştur.

Yatan hastalardan izole edilen suşların %42'sinde, poliklinik hastalarından izole edilen suşların %14.2'sinde GSBL üretimi saptanmıştır.



Şekil 15: *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL üretim oranları

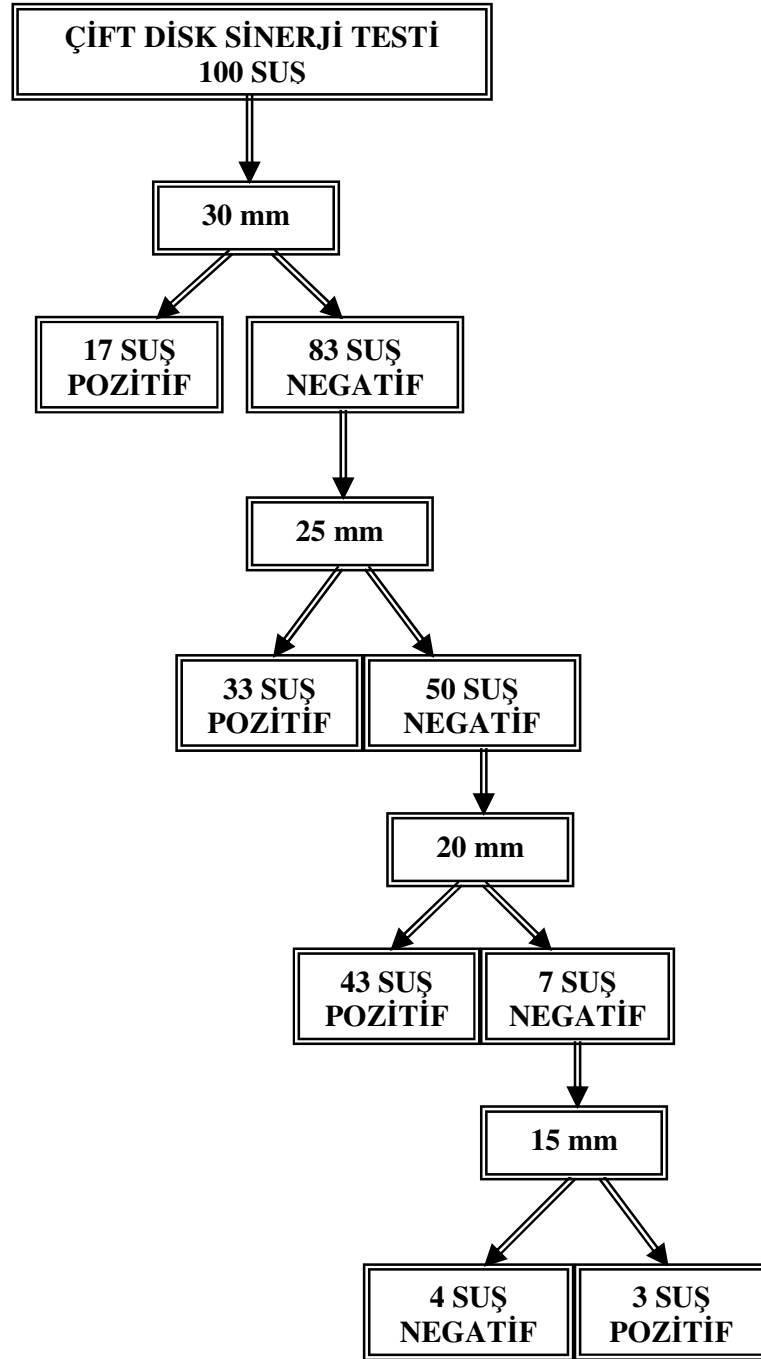
Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL üretimi saptanmayan bir *K.oxytoca* ve bir *Enterobacter cloacae* suşunda üç boyutlu test, bir *C.youngae*, bir *E.cloacae* suşunda üç boyutlu ve spot inokulasyon testiyle, bir *M.morganii*, bir *K.oxytoca* suşunda üç boyutlu, spot inokulasyon ve çift disk sinerji testleriyle, bir *E.coli* suşunda üç boyutlu ve çift disk sinerji testleriyle ve bir *E.coli* suşunda çift disk sinerji testi ile GSBL üretimi saptanmıştır.

Çift disk sinerji testinin duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %50, üç boyutlu testin duyarlılığı %95.7 ve özgüllüğü %12.5, spot inokulasyon testinin duyarlılığı %93.5 ve özgüllüğü %50, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testinin duyarlılığı %98.9 ve özgüllüğü %100, mikrodilüsyon testinin duyarlılığı %98.9 ve özgüllüğü %100 bulunmuştur (Tablo VIII). Fenotipik doğrulama testlerinin pozitif ve negatif prediktif değerleri tablo VIII’de sunulmuştur

TabloVIII: Fenotipik doğrulama testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif (PPD) ve negatif prediktif(NPD) değerleri

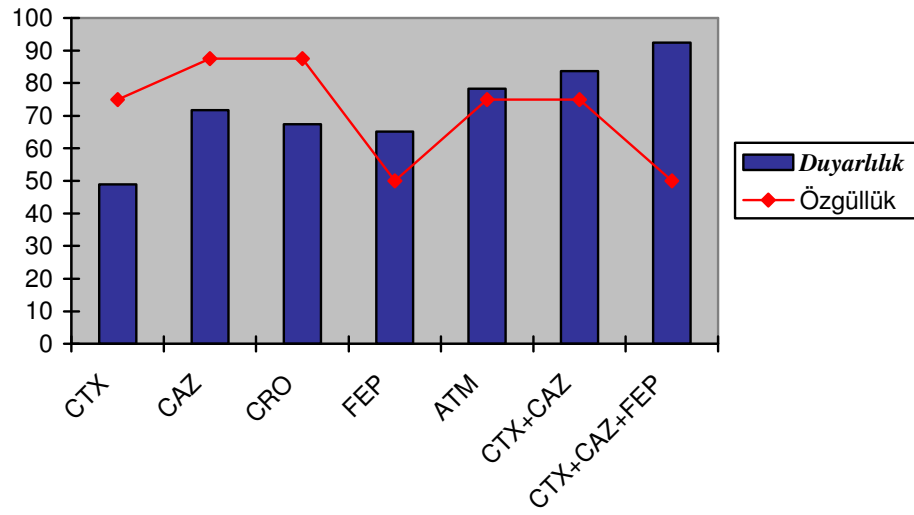
TEST	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	PPD(%)	NPD(%)
Çift disk sinerji	100	50	95,8	100
Üç boyutlu test	95,7	12,5	92,6	20
Spot inokulasyon	93,5	50	95,6	40
İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon	98,9	100	100	88,9
Mikrodilüsyon	98,9	100	100	88,9

Çift disk sinerji testinde antibiyotikler arası uzaklık 30 mm'ye ayarlandırıldığında 100 suşun 17'sinde test olumlu olarak bulunmuştur. Kalan 83 suшта diskler arası uzaklık 25 mm' ye indirilip test tekrarlığında ek olarak 33 suшта GSBL saptanmıştır. Yine kalan 50 suшта diskler arası uzaklık 20 mm'ye indirildiğinde ise 43 suшта daha GSBL saptanmıştır. Çalışmaya alınan 100 suştan kalan yedi tanesi ise diskler arası mesafe 15 mm' ye düşürülerek tekrar test edildiğinde üç suшта daha GSBL saptanmıştır. 100 suşun dördünde ise çift disk sinerji testi ile GSBL üretimi saptanmamıştır (Şekil 16).



Şekil 16:Çift disk sinerji test sonuçlarına diskler arası uzaklığın etkileri

Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL üretimi saptanmayan dört suşta (*bir Morganella morganii*, iki *E.coli*, bir *K.oxytoca*) çift disk sinerji yöntemiyle GSBL üretimi olumlu bulunmuştur. Çift disk sinerji testinde kullanılan antibiyotiklerin özgüllük ve duyarlılıkları şekil 17’de sunulmuştur. Test edilen antibiyotiklerin negatif ve pozitif prediktif değerleri tablo IX’da sunulmuştur.

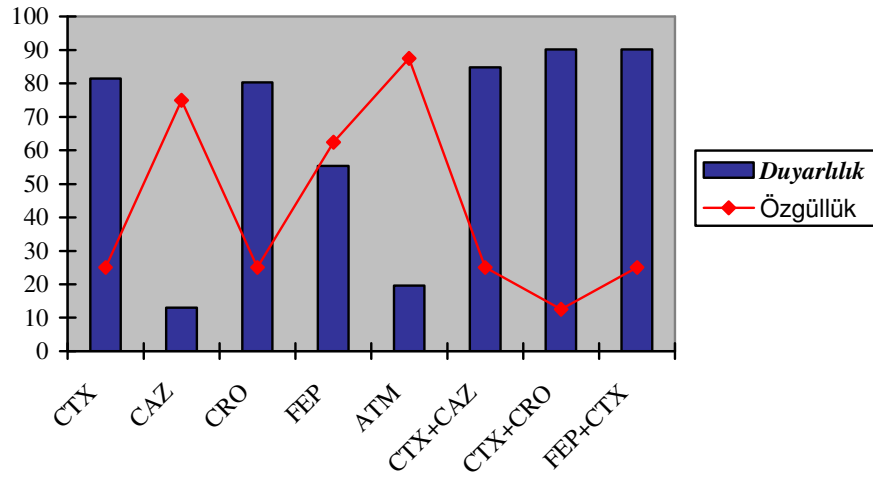


Şekil 17:Çift disk sinerji testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık ve özgüllükleri

Tablo IX: Çift disk sinerji testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif(PPD) ve negatif prediktif(NPD) değerleri

Antibiyotik	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	PPD(%)	NPD(%)
CTX	48,9	75	95,7	11,3
CAZ	71,7	87,5	98,5	21,2
CRO	67,4	87,5	98,4	18,9
FEP	65,2	50	93,8	11,1
ATM	78,3	75	97,3	23,1
CTX+CAZ	83,7	75	97,5	28,6
CTX+CAZ+FEP	92,4	50	95,5	36,4

Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL ürettiği bulunan dört suş (üç *E.coli*, bir *Klebsiella pneumoniae*) üç boyutlu testle saptanamazken, standart testle saptanamayan yedi suшта (bir *C.youngae*, iki *K.oxytoca*, iki *E.cloacae*, bir *M.morganii*, bir *E.coli*) ise bu yöntemle GSBL üretimi olumlu bulunmuştur. Üç boyutlu testte kullanılan antibiyotiklerin özgüllük ve duyarlılıkları şekil 18’de sunulmuştur. Test edilen antibiyotiklerin negatif ve pozitif prediktif değerleri tablo X’da sunulmuştur.

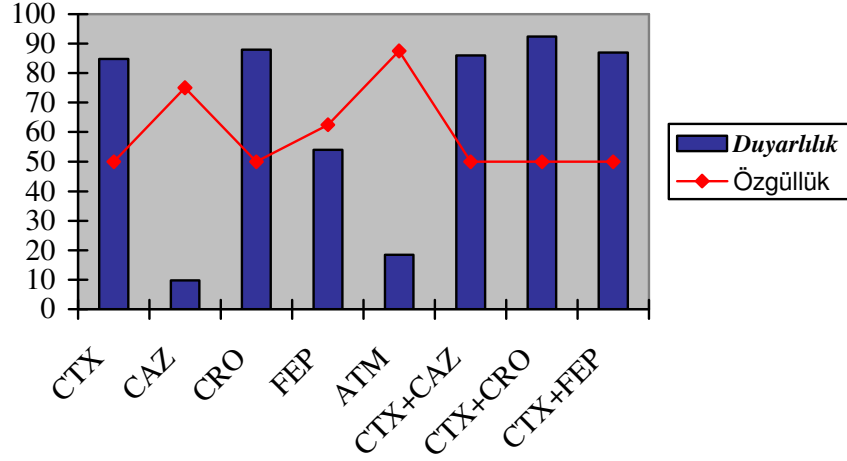


Şekil 18: Üç boyutlu testte kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık ve özgüllükleri

Tablo X:Üç boyutlu testte kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif(PPD) ve negatif prediktif(NPD) değerleri

Antibiyotik	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	PPD(%)	NPD(%)
CTX	81,5	25	92,6	10,5
CAZ	13	75	85,7	7
CRO	80,4	25	92,5	10
FEP	55,4	62,5	94,4	10,9
ATM	19,6	87,5	94,7	8,6
CTX+CAZ	84,8	25	92,9	12,5
CTX+CRO	90,2	12,5	92,2	10
FEP+CTX	90,2	25	93,3	18,2

Spot inokulasyon testinde kullanılan antibiyotiklerin özgüllük ve duyarlılıkları şekil 19’da sunulmuştur. Test edilen antibiyotiklerin negatif ve pozitif prediktif değerleri tablo XI’da sunulmuştur.

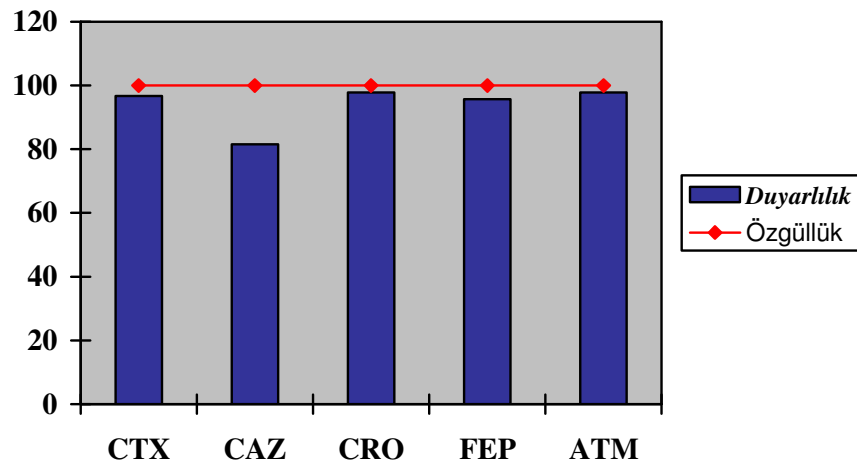


Şekil 19:Spot inokulasyon testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık ve özgüllükleri

Tablo XI:Spot inokulasyon testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif(PPD) ve negatif prediktif(NPD) değerleri

Antibiyotik	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	PPD(%)	NPD(%)
CTX	84,8	50	95,1	22,2
CAZ	9,8	75	81,8	6,7
CRO	88	50	95,3	26,7
FEP	54	62,5	94,3	10,6
ATM	18,5	87,5	94,4	8,5
CTX+CAZ	85,9	50	95,2	23,5
CTX+CRO	92,4	50	95,5	36,4
CTX+FEP	87	50	95,2	25

İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi, kombine disk difüzyon testiyle GSBL üretimi saptanan bir *S.liquefaciens* suşunda enzim üretimini saptayamamıştır. Disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotiklerin özgüllük ve duyarlılıkları şekil 20’de sunulmuştur. Test edilen antibiyotiklerin negatif ve pozitif prediktif değerleri tablo XII’da sunulmuştur.

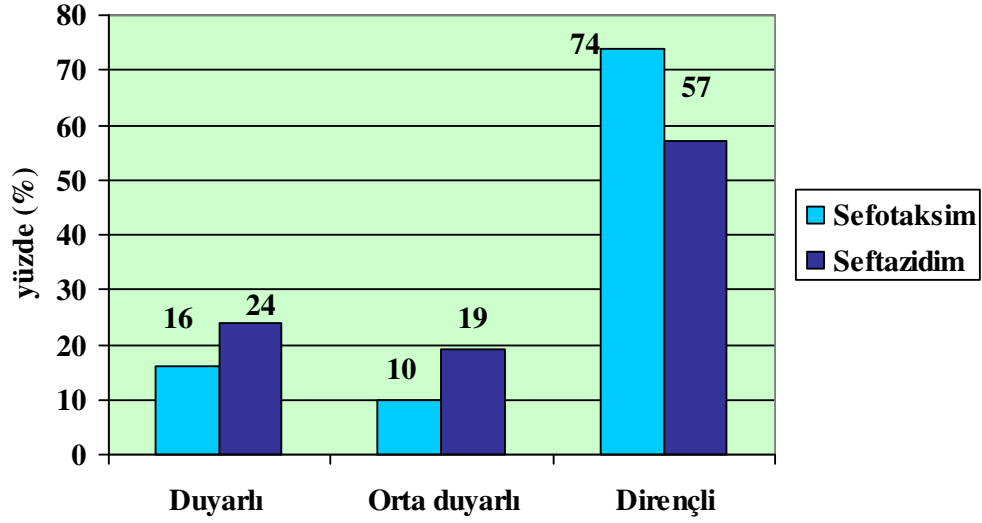


Şekil 20:İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık ve özgüllükleri

Tablo XII:İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testinde testinde kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif(PPD) ve negatif prediktif(NPD) değerleri

Antibiyotik	Duyarlılık(%)	Özgüllük(%)	PPD(%)	NPD(%)
CTX	96,7	100	96,7	72,7
CAZ	81,5	100	100	32
CRO	97,8	100	100	80
FEP	95,7	100	100	66,7
ATM	97,8	100	100	80

Mikrodilüsyon testi, kombine disk difüzyon testiyle GSBL üretimi saptanan bir *Serratia liquefaciens* suşunda GSBL üretimini saptayamamıştır. Sefotaksim ve seftazidimin duyarlılıkları %92.4, özgüllükleri %87.5 pozitif prediktif değerleri %98.8, negatif prediktif değerleri %50 bulunmuştur. Mikrodilüsyon testine göre 100 suşun sefotaksim ve seftazidimin duyarlılıkları şekil 21’de sunulmuştur.



Şekil 21:Fenotipik doğrulama testine alınan 100 *Enterobacteriaceae* suşunun mikrodilüsyon yöntemiyle sefotaksim ve seftazidim duyarlılıkları

TARTIŞMA

Son yıllarda antimikrobiyallere karşı gelişen direnç dünyanın bir çok bölgesinde giderek artmaktadır (84). Beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç te Gram negatif bakterilerin oluşturdukları infeksiyonların tedavisinde soruna yol açmaktadır (71). Günümüzde kullanımda olan bir çok beta laktam antibiyotiği hidrolize etme özelliğine sahip genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) bu sorunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır (71).

İlk beta laktamaz enzimi 1940 yılında bir *E.coli* suşundan izole edilmiştir. Yeni sentezlenen geniş spektrumlu beta laktamları hidroliz edebilen ilk enzim olan SHV-2 1983 yılında Almanya’da bir *Klebsiella ozaenae* suşunda bulunmuştur ve birkaç yıl içinde tüm dünyaya yayılan GSBL enzimlerinin sayısı günümüzde 350’yi geçmiştir (6, 41, 79).

GSBL’ler tüm dünyada saptanmalarına rağmen bu enzimi üreten mikroorganizmaların sıklığı bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir (5). Yine GSBL enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesinin bir çok üyesinde görülmekle beraber en sık *K.pneumoniae* suşlarından izole edilmektedir (6).

SENTRY antimikrobiyal surveyans programı kapsamında 1998-1999 yıllarında Güney Afrika ve Asya Pasifik bölgesinde yapılan çalışmada *E.coli* suşlarında GSBL sıklığı %0 ile %35 arasında bulunmuştur. En yüksek GSBL üretim sıklığı %35 ile Çin’de saptanırken, Avustralya’daki bir merkezde izole edilen suşlarda GSBL üretimi saptanmamıştır. Aynı çalışma kapsamında Güney Afrika, Çin ve Japonya’da izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında %20’nin üzerinde GSBL üretimi bildirilmiştir. SENTRY

antimikrobiyal surveyans programı kapsamında 1997-1999 yıllarında yapılan çalışmada ise GSBL sıklığı *K.pneumoniae* suşlarında Latin Amerika'da %45, Batı Pasifik bölgesinde %24.6, Avrupa'da %23, Amerika'da %8 ve Kanada'da %5, *E.coli* suşlarında Latin Amerika'da % 8.5, Batı Pasifik bölgesinde %7.9, Avrupa'da %5.3, Amerika'da %3.3 ve Kanada'da % 4.2 olarak bulunmuştur (5, 83).

Avrupa'da da GSBL üretim sıklığı açısından ülkeler arasında farklılık gözlenmektedir. Almanya'da 1999 yılında yapılan bir çalışmada *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında %1'in altında, 1998 yılında İspanya'da yapılan bir başka çalışmada ise yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında %40 oranında GSBL üretimi saptanmıştır (54, 70). 2006 yılında Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada hastanede yatan hastalardan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının %24.2'sinde GSBL üretimi saptanmıştır (42).

Pakistan'da 2003 yılında Shah ve arkadaşları nozokomiyal *E.coli* suşlarında %28.5, *Klebsiella pneumoniae*'de %70, poliklinik izolatlarında *E.coli*'de %6.25 ve *K.pneumoniae*'de %7.32 oranında GSBL üretimi saptamışlardır (63).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da GSBL üretim sıklığı farklılık göstermektedir. 1998-2005 yılları arasında yapılan farklı çalışmalarda *E.coli* suşlarında %0-63, *Klebsiella pneumoniae* suşlarında %15-77 oranında GSBL üretimi saptanmıştır. (1, 3, 11, 17, 19, 38, 39, 51).

1998 yılında GATA Haydarpaşa Eğitim hastanesinde izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında %15, aynı yıl Ankara Üniversitesinde %44 ve Pamukkale Üniversitesinde %47 oranında GSBL üretimi saptanmıştır (3, 17, 39).

1999 yılında Türkiye’de yapılan ve 9 üniversite hastanesi laboratuvarının katıldığı çalışmada, Gram negatif bakterilerin beta laktam antibiyotiklere duyarlılıkları E-test yöntemiyle saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada *E.coli*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* suşlarında sefepime %1.1-2.7, sefotaksime %7.6-26.9, seftazidime %15.7-45.7 arasında direnç saptanmıştır (55).

Köseoğlu ve arkadaşları’nın 2001 yılında Hacettepe Üniversitesinde yaptıkları çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *E.coli* suşlarında % 36.5, *K.pneumoniae* suşlarında %35.1 ve *Enterobacter* suşlarında % 8.8 oranında GSBL üretimi saptanmıştır (43).

Bülüş ve arkadaşları 2003 yılında İstanbul Üniversitesinde yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* suşlarının %48, *E.coli* suşlarının %14 ve *K.oxytoca* suşlarının %40 oranında GSBL oluşturduğunu saptamışlardır (11).

Ülkemizde 2003 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada (MYSTIC 2003) hastane kaynaklı *E.coli* suşlarında %31, *K.pneumoniae* suşlarında %48 ve *K.oxytoca* suşlarında %26 oranında GSBL üretimi saptanmıştır. Aynı zamanda *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında sırasıyla seftazidime %35-39.5, sefotaksime %40.6-50.7 ve sefepime %34.8-35.5 oranında direnç gözlenmiştir (27).

2004 yılında yapılan başka bir çok merkezli çalışmada (HITIT 2004) *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında sırasıyla seftriakson, seftazidim ve sefepime %25-36.4 oranında direnç saptanmıştır (27).

2005 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde Çetinkaya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hastane kaynaklı 68 *Klebsiella spp.* suşunun 13 (%19)’ünün GSBL oluşturduğu saptanmıştır. Aynı çalışma kapsamında klinik izolatlardan izole edilen 78

Klebsiella suşunun sefotaksime %19, seftazidime ve sefepime %23 oranında dirençli olduğu bulunmuştur (16).

Delialioğlu ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada klinik hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında %29, *K.pneumoniae*'de %35.8, *K.oxytoca*'da %6.7 ve poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* suşlarında %7.7, *K.pneumoniae*'de %15.4 oranında GSBL üretimi saptanmıştır (19).

Hastanemizde 2000 yılında Rota ve arkadaşları yaptıkları araştırmada *E.coli* suşlarında %21.4, 2005 yılında Kaçmaz ve arkadaşları ise hastane kaynaklı infeksiyonlardan elde edilen *K.pneumoniae* suşlarında %77, *E.coli* suşlarında %63 ve *K.oxytoca* suşlarında %64 oranında GSBL üretimi saptamışlardır (38, 60)

Çalışmamızda 386 *Enterobacteriaceae* suşunun %23.8'inde GSBL üretimi saptanmıştır. Çalışmaya alınan *K.pneumoniae* suşlarının %38.2'nin, *E.coli* suşlarının %23.4'ünün, *K.oxytoca* suşlarının % 9.1'nin ve bunlar dışındaki suşların %14.2'sinin GSBL oluşturduğu saptanmıştır. GSBL oluşturmanın; hastanede yatan hastalardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarında %42.2, *K.pneumoniae*'de %61.5 ve poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* suşlarında %15.7, *K.pneumoniae*'de %9.5 oranında pozitif olduğu görülmüştür. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemiyle *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında sırasıyla sefepime %14-17, sefotaksime %19-31, seftazidime %13-24, seftriaksona %17-28 oranında direnç gözlenmiştir.

Hastanemizde saptanan bu oranların Türkiye'de yapılan çok merkezli çalışmalarla, benzer hasta popülasyonlarına ve yoğun bakım kapasitesine sahip büyük üniversite hastaneleriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ancak araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz

GSBL oranları Amerika ve Kanada gibi gelişmiş ülkelere göre yüksek, yine ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerle uyumlu olarak bulunmuştur. Bazı dünya ülkelerine göre nispeten yüksek olarak saptanan bu GSBL üretim oranlarının, toplum kökenli infeksiyonlar ve hastane infeksiyonlarında ampirik tedavide geniş spektrumlu sefalosporinlerin sıkça kullanımına ve yine geniş spektrumlu antibiyotiklerin reçetesiz olarak toplumumuz tarafından gelişigüzel kullanımına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

GSBL enzimleri, penisilinleri, birinci kuşak sefalosporinleri, seftazidim, sefotaksim, seftriakson gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı inhibe etmektedir (6). Bakterilerin GSBL üretimi rutin antibiyotik duyarlılık testleriyle saptanamamaktadır (57). GSBL üreten suşların büyük çoğunluğu *in vitro* testlerde sefalosporinlere ya düşük düzeyde direnç göstermekte ya da tamamen duyarlı olarak saptanmaktadır. Bu nedenle rutin testlere dayanılarak dirençli suşlar yanlış olarak sefalosporinlere duyarlı olarak değerlendirilmektedir (35).

Siroto ve arkadaşlarının 1992 yılında Fransa’da yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* suşlarında sefalosporin duyarlılıklarının rutin duyarlılık testlerine dayanılarak rapor edildiğinde sonuçların yarısının yanlış değerlendirildiğini farketmişlerdir. GSBL saptanmasından sonra suşların yarısının aslında sefalosporinlere dirençli olarak bildirilmesi gerektiğini saptamışlardır (66).

Gülay ve arkadaşları yaptıkları çalışmada GSBL üreten suşlarda disk difüzyon testiyle sefotaksim için %46.2, seftazidim için %35.9, aztreonam için %28.2 oranında yalancı duyarlılık saptamışlardır (24).

Çalışmamızda GSBL saptanmasından sonra disk difüzyon yöntemiyle bulunan direnç oranlarında, sefotaksim ve seftriksonda %5'lik, seftazidim ve sefepimde %10'luk, aztreonamda ise %8'lik artış görülmüştür.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sentezleyen bakterilerle infekte hastalarda morbidite ve mortalite artmıştır ve bu enzimler plazmidler aracılığıyla özellikle hastane kaynaklı suşlar arasında hızla yayılarak salgınlara yol açabilmektedir. Bu nedenle bu enzimlerin en kısa zamanda ve doğru olarak saptanması çok önemlidir (71).

Gram negatif bakterilerde GSBL saptanması için farklı testler geliştirilmiştir. CLSI GSBL doğrulama testi olarak sefalosporin ve sefalosporinle kombine klavulonik asit disklerinin kullanıldığı disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerini önermektedir (14). Bu testlerin yanı sıra farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiş testler de günümüzde hem araştırma amaçlı laboratuvarlarda hem de rutin laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu testlerden üç boyutlu test, spot inokulasyon testi, çift disk sinerji testi, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi ve CLSI tarafından önerilen testler araştırmamızda değerlendirilmiştir.

Kombine disk difüzyon yöntemi CLSI tarafından *E. coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* suşları için önerilen fenotipik GSBL doğrulama testidir. CLSI bunlar dışındaki *Enterobacteriaceae* suşlarında GSBL saptanması için herhangi bir yöntem önermemektedir (14). Test, beta laktamaz inhibitörü eklenmiş sefalosporin diskleri etrafında, sadece sefalosporin içeren disklere göre zon genişlemesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada kombine disk difüzyon yöntemi *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve bunlar dışındaki *Enterobacteriaceae* suşlarına da uygulanmıştır. Kombine disk difüzyon yöntemiyle tarama

testi olumlu bulunan 69 *E.coli* suşunun 67 (%97)'sinde, 18 *K.pneumoniae* suşunun 18 (%100)'inde, üç *K.oxytoca* suşunun birinde (%33) ve bunlar dışındaki on *Enterobacteriaceae* suşunun altısında (%60) GSBL üretimi saptanmıştır.

Kombine disk difüzyon yöntemi rutin disk difüzyon yöntemiyle aynı anda uygulanabilen kolay bir testtir. Yöntemde kullanılan sefotaksim/klavulonat ve seftazidim/klavulonat diskleri rutin disk difüzyon testiyle aynı anda tek plağa uygulanabilir. Rutin yöntemlere ek bir işleme gerek yoktur. Diskler etrafındaki zon çapının ölçülüp, beta laktamaz içermeyen seftazidim ve sefotaksim disklerine göre zon çapında 5 mm ve üzerinde genişleme olup olmadığının saptanması yeterlidir. Özel eğitilmiş personel ve ek zaman gerektirmemektedir. Kullanılan diskler laboratuvarında hazırlanabildiği gibi, ticari olarak da sağlanabilir. Ancak bu test CLSI tarafından *E.coli* ve *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* dışındaki *Enterobacteriaceae* suşları için önerilmemektedir. Bu suşlar için CLSI tarafından kabul edilen ve doğruluğu onaylanmış fenotipik test bulunmamaktadır. Ancak bir çok araştırmacı kabul gören fenotipik yöntemleri bu suşlar üzerinde denemektedir.

Amerika'da 2004 yılında Schawaber ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* dışındaki 690 *Enterobacteriaceae* suşunun 355'inde (%51,4) GSBL tarama olumlu bulunmuş ve 15'inde (%1,7) GSBL üretimi kombine disk difüzyon yöntemiyle doğrulanmıştır. GSBL üretimi saptanamayan suşların %80'inde ise AmpC beta laktamaz üretimi saptanmıştır. Fenotipik olarak GSBL ürettiği saptanan 15 suşu PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile incelediklerinde dört suşta bla TEM ve bla SHV, bir suşta sadece bla TEM ve bir suşta sadece bla SHV genleri saptamışlardır. Bu altı suşta izoelektrik odaklama yöntemiyle de TEM ve SHV beta laktamazla uyumlu bantlar

saptanmıştır. Fenotipik olarak GSBL üretimi saptanan dokuz suşta ise izoelektrik odaklama yöntemiyle beta laktamaz bandı saptanamamıştır (62).

GSBL doğrulama testi pozitif bulunan suşlarda, AmpC enzimlerinin yanı sıra GSBL dışı beta laktamazlar da bulunabilmektedir. Örneğin *Citrobacter diversus*'ta GSBL olarak sınıflandırılmayan, kromozomal kaynaklı ve klavulonik asitle inhibe olan geniş spektrumlu beta laktamazlar bulunabilmektedir. Yine *Serratia marcescens* ve *Enterobacter cloacae*'da bulunan OHIO-1 enzimi bu tip beta laktamazlara örnektir (62).

Çalışmamızda *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* dışı 42 *Enterobacteriaceae* suşuna GSBL tarama testi uygulanmıştır. Bu suşların %23'ünde (n=10) tarama testi olumlu bulunmuştur ve bunların %60'ında (n=6) GSBL üretimi saptanmıştır. GSBL tarama testi olumlu bulunan suşların dördünde kombine disk difüzyon yöntemiyle klavulonik asit etkisi gözlenmiştir. Kombine disk difüzyon yöntemiyle negatif bulunan dört suşun ise diğer doğrulama yöntemleriyle GSBL ürettiği bulunmuştur. Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL saptanmayan dört suşun üçü (*C.youngae* (1), *E.cloacae* (2)) sefoksitine dirençli, sefepime duyarlı bulunmuştur. Bu üç suşun sefepime duyarlı olup sefoksitine direnç göstermesi AmpC beta laktamaz üretimi lehine yorumlanmıştır. Bir adet *M. morganii* suşunda ise sefoksitine direnç gözlenmemiştir. Aynı anda GSBLve AmpC beta laktamazlarını beraber üreten suşlarda klavulonik aside direnç gözlendiğinden klavulonik asit etkisi gözlenememektedir. *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* dışı *Enterobacteriaceae* suşlarında GSBL dışında başka beta laktamaz içermeleri durumunda tarama testleri ve fenotipik doğrulama yöntemleri yetersiz kalmakta, yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı rutin laboratuvarlarda bu gibi suşlar için

CLSI'nın önerdiği fenotipik yöntemler başarısız olmaktadır ve bu suşların kesin tanısı için moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir.

GSBL saptanmasında en yaygın kullanılan yöntem olan çift disk sinerji testi ilk kez 1988 yılında Jarlier tarafından tanımlanmıştır. Bu test amoksisilin klavulonik asit diskinin etrafına yerleştirilen sefalosporin disklerinin zonlarında klavulonik asit diskinin doğru genişleme görülmesi esasına dayanmaktadır. Bu testin yapılabilmesi için beta laktamaz içeren bir antibiyotik diski ile sefalosporin diskleri yeterli olmaktadır. Testte yer alan disklerin çoğu zaten rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan ve test edilmesi gereken antibiyotiklere ait olduğu için ek mali yük getirmez ve fazladan zaman harcanmasına gerek yoktur. Ancak amoksisilin klavulonat ve sefalosporin diskleri arasındaki uzaklık ve enzim substrat profili testin duyarlılığını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (25, 36, 67).

Çift disk sinerji yönteminde diskler uygun uzaklıkta yerleştirilmediğinde sinerjik etki gözlenememekte ve bu da testin tekrarına veya sonuçların yanlış olarak negatif değerlendirilmesine sebep olmaktadır.

Thomson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklık 30 mm'den 20 mm'ye yaklaştırıldığında testin duyarlılığının %79'dan %82'ye çıktığını bulmuşlardır (76).

Ho ve arkadaşları 2000 yılında *E.coli* ve *Klebsiella* suşları ile yaptıkları araştırmada çift disk sinerji testinde uzaklık 30 mm'den 25 mm'ye yaklaştırıldığında duyarlılığın %83.8'den %97.9'a çıktığını ve kalan suşlar 20 mm uzaklıkta tekrar test edildiğinde üç suşta daha GSBL üretimini saptamışlardır (33).

Çalışmamızda sefalosporin diskleri 30 mm uzağa yerleştirildiğinde testin duyarlılığı %18.5, 25 mm’de ise %52 olarak bulunmuştur. Diskler arası uzaklık 20 mm’ye indirildiğinde duyarlılık büyük bir artış göstererek %97.8’e çıkmıştır. Çalışmamızdan elde edilen bu verilere dayanılarak çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklığın 20 mm olarak uygulanmasının doğru olacağı düşünülmüştür. Bununla beraber çalışmamızda test edilen suşların birçoğunun antibiyotik inhibisyon zon çaplarının çok dar olduğu gözlenmiştir. Bu suşların rutin disk difüzyon yöntemiyle de dirençli oldukları saptanmıştır. Bu nedenle diskler arası uzaklık 30 mm’ye ayarlandığında GSBL pozitif 92 suşun ancak 17 tanesinde test olumlu sonuç vermiştir.

Mac Kenzie ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, çift diskj sinerji testinde sefaperazon ve sefpodoksimin en duyarlı (%91) antibiyotikler oldukları bulmuşlardır. Ayrıca sefotaksim duyarlılığı %81, seftazidimin duyarlılığı %70, seftriaksonun duyarlılığı %78 ve sefepimin duyarlılığı %82 olarak bulunmuştur (46).

Ho ve arkadaşları ise aztreonam ve seftriaksonun duyarlılığını %73.9, seftazidimin duyarlılığını %25.4 olarak bulmuşlardır (33).

Gülay ve arkadaşlarının kontrol suşlarıyla yaptıkları çalışmada, çift disk sinerji testinde duyarlılık, seftazidim için %79, aztreonam için %95 olarak bulunmuştur (25).

Bu çalışmada tek başlarına kullanıldıklarında antibiyotiklerin duyarlılıklarının sefotaksim için %48.9, seftazidim için %71.7, aztreonam için ise %78.3 olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında sefotaksim duyarlılığının düşük, seftazidimin duyarlılığının ise yüksek olarak bulunmasının bakterilerin enzim substrat profilinin farklı olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (46, 33).

GSBL saptanması için farklı antibiyotik kombinasyonları kullanılmaktadır. CLSI birden fazla antimikrobiyal ajanın kullanılmasının duyarlılığı arttıracığını belirtmiştir (14). Çalışmamızda çift disk sinerji testinde duyarlılık sefotaksim ve seftazidim kombinasyonu için %83.7, sefotaksim, seftazidim ve sefepim kombinasyonu için %92.4 olarak saptanmıştır

Bu çalışmada çift disk sinerji testinin duyarlılığı %100 olmasına rağmen özgüllüğü ise %50 olarak bulunmuştur. Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL üretimi saptanmayan dört suşta (bir *M.morganii*, iki *E.coli*, bir *K.oxytoca*) çift disk sinerji yöntemiyle GSBL üretimi olumlu bulunmuştur. Çift disk sinerji testinin GSBL üretimine spesifik olmadığını bildiren yayınlar bulunmaktadır. Bazı *Enterobacteriaceae* suşları üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edip aynı zamanda klavulonatla inhibe olabilen kromozomal beta laktamazları çok miktarda sentezleyebilmektedir. Bu tip enzimler sentezleyen suşlarda çift disk sinerji testinde GSBL üretimine benzer görüntüler ortaya çıkabilmekte ve yanlışlıkla GSBL üretimi lehine yorumlanmaktadır. Bu enzimler GSBL olmamalarına rağmen bu suşların üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olarak bildirilmeleri yanlış olmayacaktır. Bu çok küçük bir hata payı olarak görülebilir ancak epidemiyolojik çalışmalarda bu suşların moleküler yöntemler gibi daha ileri tekniklerle araştırılması ve enzim tiplendirilmesinin yapılması doğru olacaktır (46, 62, 67).

Çalışmamızda çift disk sinerji testinin rutin disk difüzyon testiyle aynı anda uygulanabilecek, ek mali harcama ve zaman gerektirmeyen, rutin laboratuvarlarda kolaylıkla kullanılabilecek duyarlı bir test olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak diskler arası uzaklığın ve enzim substrat profillerinin testin özgüllüğünü önemli oranda değiştireceği için, laboratuvarların diskler arası uzaklığı ve testte kullanılacak antibiyotikleri bulunduğu bölge

ve hastanenin genel direnç oranlarını, enzim tiplerini göz önüne alarak belirlemesinin doğru olacağı düşünülmüştür.

Üç boyutlu test ilk kez Thomson tarafından 1984 yılında tanımlanmış ve kullanılmıştır. Orijinal teknikte besiyerinin dairesel şekilde kesilmesi için plağın üzerine yerleştirildiği döner bir tablaya ihtiyaç duyuluyordu. Daha sonraki yıllarda Vercauten ve arkadaşları bakteri süspansiyonunun veya enzim ekstraktının besiyerinde silindir şeklinde bir kuyucuğa yerleştirildiği yeni bir teknik geliştirdiler ancak bu teknikte de kuyucuğun besiyerinde açılması ve uygun şekilde doldurulması oldukça zordu. Plakların inkubasyonu sırasında bakteri süspansiyonun besiyeri yüzeyine yayılması durumunda testin tekrarlanması gerekiyordu (48, 75, 81). Çalışmamızda bu iki teknikten daha kolay uygulandığı düşünülen Shahid ve ark. tarafından uyarlanan üç boyutlu test kullanılmıştır. Bu teknikte besiyeri bir bistüri yardımıyla çizgi şeklinde kesildikten sonra toplanan bakteri kolonileri öze yardımı ile bu kesinin içine batırılarak ekim yapılmaktadır (64).

Shahid ve ark yaptıkları çalışmada, CLSI'in önerdiği fenotipik doğrulama testleriyle GSBL ürettiği saptanan suşlar üzerinde Vercauten ve ark. kullandığı yöntem ile kendi uyarladıkları yöntemi karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda kendi uyarladıkları üç boyutlu testin tüm suşları doğru olarak saptadığını bulmuşlar ve uygulamanın daha kolay olduğunu belirtmişlerdir (64).

Menon ve ark. yaptıkları çalışmada test ettikleri suşların %85.7'sinin üç boyutlu yöntemle saptanırken çift disk sinerji testiyle sadece %14.2'sinin saptanabildiğini bulmuşlardır (50).

Datta ve ark. çeşitli beta laktam antibiyotiklere dirençli 300 *Enterobacteriaceae* suşu kullanarak yaptıkları çalışmada üç boyutlu testle 23, çift disk sinerji testiyle 15, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testiyle 34 suşta GSBL üretimi saptamışlardır (18).

Thomson ve ark 1992 yılında yaptıkları çalışmada izoelektrik odaklama yöntemiyle GSBL üretimi doğrulanan *Enterobacteriaceae* suşlarının %93'ünde üç boyutlu test, %79'unda ise çift disk sinerji testiyle enzimi saptamışlardır (76).

Thomson ve arkadaşlarının aksine Vercauteren ve ark yaptıkları çalışmada çift disk sinerji testinin (%96.9) üç boyutlu testten (%90.6) daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır (81).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Akyıldız ve arkadaşları üç boyutlu ve çift disk sinerji testleriyle %13 oranında, Hoşgör ve arkadaşları ise çift disk sinerji testiyle %30, üç boyutlu testle %35 oranında GSBL üretimi saptamışlardır (3, 34).

Çalışmamızda suşların %24.6 sında üç boyutlu test ile, %24.8'sinde çift disk sinerji testi ile ve %23.8'inde komdine disk difüzyon yöntemiyle GSBL üretimi saptanırken, kombine testle karşılaştırıldığında üç boyutlu testin duyarlılığı %95.7, çift disk sinerji testinin duyarlılığı ise %100 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda üç boyutlu testte sefotaksim ve seftriakson disklerinin seftazidime göre daha duyarlı bulunduğu bildirilmiştir (18, 46, 76). Çalışmamızda da bu çalışmalar ile uyumlu olarak seftazidimin duyarlılığı oldukça düşük (%14), bunun yanısıra sefotaksim (%81.5) ve seftriaksonun (%80.4) tek başlarına kullanıldıklarında testin en duyarlı olduğu bulunmuştur. Sefotaksim ve seftriakson yada sefepimin kombine kullanılması durumunda ise testin duyarlılığının %90'lara ulaştığı gözlenmiştir.

Kombine disk difüzyon yöntemiyle GSBL ürettiği bulunan dört suş (üç *E.coli*, bir *Klebsiella pneumoniae*) üç boyutlu testle saptanamazken, standart testle saptanamayan yedi suшта (bir *C.youngae*, iki *K.oxytoca*, iki *E.cloacae*, bir *M.morganii*, bir *E.coli*) ise bu yöntemle GSBL üretimi olumlu bulunmuştur

Üç boyutlu test diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yöntemin uygulanabilmesi için fazla miktarda bakteriye ihtiyaç duyulmaktadır, bu nedenle az miktarda üreme olan durumlarda doğrudan kültürden çalışmanın zor olduğu ve bakterinin çoğaltılması için fazladan bir gün gerektiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan üç boyutlu testin duyarlılığının %95.7 olması, aynı zamanda Thomson ve Vercauteren tarafından geliştirilen üç boyutlu testlerden daha uygulanabilir görünmesine rağmen özgüllüğünün (%12.5) diğer testlerle karşılaştırıldığında oldukça düşük olması, sonuçların bir veya iki gün geç alınması, rutin duyarlılık testlerine ek olarak işlem gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvar da kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmüştür.

Spot inokulasyon testi Shahid ve arkadaşları tarafından 2004 yılında tanımlanmıştır. Daha önce GSBL üretimi saptanmış suşlar kullanarak yaptıkları çalışmada modifiye edilmiş üç boyutlu yöntemi ve spot inokulasyon testini karşılaştırmışlardır. Spot inokulasyon testinin tüm suşları doğru olarak saptayan tek test olduğunu bulmuşlardır (64). Ancak literatürde bu yöntem kullanılarak yapılan başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda spot inokulasyon testinin duyarlılığı %93.5, özgüllüğü %50 olarak bulunmuştur. Spot inokulasyon testi çalışmada araştırılan diğer yöntemler arasında duyarlılığı en düşük bulunan test olmuştur. Kombine disk difüzyonla GSBL üretimi saptanan altı suşu (beş *E.coli*, bir *K.pneumoniae*) saptayamazken, kombine disk difüzyon yöntemiyle

GSBL saptanmayan dört suşta (bir *C.youngae*, bir *E.cloacae*, bir *K.oxytoca*, bir *M.morganii*) spot inokulasyon testiyle GSBL üretimi olumlu bulunmuştur

Üç boyutlu testte olduğu gibi bu testte de diğer testlere oranla daha fazla miktarda bakteri gerekmektedir. Tek bir antibiyotik diski ve tek plakta birden fazla bakteri aynı anda test edilebilmektedir. Spot inokulasyon testi üç boyutlu testle karşılaştırıldığında daha kolay uygulanabilmektedir, ancak yine de teknik olarak diğer yöntemlerden daha zordur ve daha uzun zaman harcanmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerle spot inokulasyon testinin rutin laboratuvarlarda kullanımının uygun olmadığı düşünülmüştür.

İnhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi (IPDDT) Mueller Hinton agara eklenen klavulonik asidin sefalosporin diskleri etrafındaki inhibisyon zonunda genişlemeye neden olması esasına dayanır. Yapılan çalışmalarda GSBL saptanmasında IPDD testinin duyarlılığının ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (32, 33, 60).

Ho ve arkadaşları 81 *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşuyla yaptıkları çalışmada IPDD testinin çift disk sinerji testinden daha duyarlı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca tek başına seftazidim kullanıldığında duyarlılığı %93 olarak bulunurken sefotaksim ve seftazidim kombinasyonu kullanıldığında duyarlılığın %100'e ulaştığını gözlemlemişlerdir (32).

Yine Ho ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada çift disk sinerji ve IPDD testi arasında bir karşılaştırma yaptıklarında çift disk sinerji testinin diskler arası uzaklık sabit tutulduğunda duyarlılığının daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. IPDD testinin rutin laboratuvarlarda GSBL doğrulanmasında kullanılabilecek ikincil test olduğunu savunmuşlardır (33).

Rota ve arkadaşları 2000 yılında 168 klinik *E.coli* izolatu ile yaptıkları çalışmada GSBL üretiminin saptanmasında hem çift disk sinerji hem de IPDD testiyle benzer sonuçlar elde etmişler ve testin rutin laboratuvarlarda kullanılmasını önermişlerdir (60).

Çalışmamızda IPDD testinin duyarlılığı %98.9, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Çift disk sinerji testiyle karşılaştırıldığında duyarlılıkların benzer olduğu görülürken bu testin özgüllüğünün yüksek oluşu çift disk sinerji testine göre bir avantaj olarak göze çarpmaktadır. Ancak teknik olarak bazı dezavantajları bulunmaktadır.

Besiyerine eklenen klavulonik asit miktarının çok az olması (4 mg/L) hassas terazi kullanılmasını gerektirmektedir ve hata yapılma olasılığı yüksektir. Toz halindeki klavulonik asit antibiyotik disklerine göre ticari olarak kolay elde edilebilen bir madde değildir ve saklama koşullarına çok dikkat edilmesi gerekmektedir. Hava ve nem geçirmeyen, soğuk ortamlarda saklanmadığında potensini kısa sürede kaybetmektedir. Kullanılacak bütün sefalosporin diskleri tek plakta test edilebilir ancak rutin disk difüzyon testine ek olarak klavulonik asit içeren plak kullanılmasını gerektirmektedir. Kombine disk difüzyon ve çift disk sinerji testiyle karşılaştırıldığında rutin duyarlılık testlerine göre iki kat besiyeri ve antibiyotik diski kullanımını gerektirdiğinden hem harcanan zamanın hem de maliyetin artmasına neden olacağı gözlenmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda IPD testinin kombine disk difüzyon ve çift disk sinerji testiyle sonuç alınamayan şüpheli suşlarda kullanılabilecek güvenilir bir ikincil test olduğu düşünülmüştür.

Sefalosporin MİK değerlerinin tek başlarına ve klavulonik asit varlığında belirlenmesiyle GSBL saptanması CLSI tarafından önerilen GSBL saptama yöntemlerindendir (14). Çalışmamızda, mikrodilüsyon testi kombine disk difüzyon testiyle

GSBL üretimi saptanan bir *S.liquefaciens* suşunda GSBL üretimini saptayamamıştır. Kombine disk difüzyon testiyle karşılaştırıldığında duyarlılığının %98.9, özgülüğünün %100 olduğu bulunmuştur. Güvenilir bir test olmasına rağmen rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek diğer fenotipik testlere göre teknik olarak daha zordur. Mikroplaktaki her kuyucukta 4 mg/L klavulonik asit bulunması için kullanılması gereken miktar çok iyi hesaplanmalıdır. Klavulonik asitin pH'ı ayarlanmış fosfat tamponunda çözülmesi gerekmektedir. Bu tamponun da hazırlanması zaman almaktadır. İnokulum miktarı da testin sonuçlarını değiştirebilir. İnokulum miktarı arttığı zaman direnç oranlarında değişiklik görülmektedir. Testin doğru yorumlanabilmesi için inokulum miktarının doğru olarak ayarlanması gerekmektedir. Sefalosporinlerin MİK değerleri test edilen sınırlar dışında olabilmektedir. MİK değeri 0.5 µg/ml altında veya 256 µg/ml üzerinde olduğunda testin değerlendirilmesi zorlaşmakta ve tekrarlanması gerekmektedir (4, 69).

Sonuç olarak genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) Gram negatif bakterilerde oluşturduğu antibiyotik direnci infeksiyonların tedavisinde önemli bir sorunu gündeme getirmektedir. Bu sorunun çözülmesinde mikrobiyoloji laboratuvarının rolü GSBL üreten bakterilerin doğru olarak, mümkün olan en kısa sürede saptanması ve klinisyene bildirilmesidir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere dayanarak çift disk sinerji testinin kısıtlı imkanlara sahip laboratuvarlarda bile uygulanabilecek ucuz, kısa sürede sonuç veren güvenilir bir test olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1-Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. Klimik Derg. 17(1): 47-49 (2004)
- 2-Akova M. Dikkat :genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) var! ANKEM Derg. 18(ek 2): 98-103 (2004)
- 3-Akyıldız R, Özsoy MF, Altunay H, Koçak N, Çavuşlu Ş, Yenen OŞ. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığı ve beta laktam antibiyotik direncinin araştırılması. KLİMİK Derg. 11(2): 53-58 (1998)
- 4-Bedenic B, Beader N,Zagar N. Effect of inoculum size on the antibacterial activity of cefpirome and cefepime against *Klebsiella pneumoniae* strains producing SHV extended spectrum beta lactamases. Clin Microbiol Infect. 7: 626-635 (2001)
- 5-Bella JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN. The SENTRY APAC study group. prevalence of extended spectrum-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa:regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1998-99). Diagn Microbiol Infect Dis. 42: 193-198 (2002)
- 6-Bradford P. Extended spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 14(4): 933-951 (2001)

- 7-Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of beta lactamases. *Antimicrob Agent Chemother.* 30(1): 6-10 (1986)
- 8-Bush K. The evolution of beta lactamases. *Mikrobiyol Bült.* 34: 7-21 (2000)
- 9-Bush K, Jacoby GA, Mederios AA. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agent Chemother.* 39(6): 1211-1233 (1995)
- 10-Bush K, Jacoby GA. Nomenclature of TEM beta lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 39: 1-3 (1997)
- 11-Bülüç M, Gürol Y, Bal Ç. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz oranları (2000-2002). *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 33: 31-34 (2003)
- 12-Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor resistant TEM beta lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemoter.* 43: 447-458 (1999)
- 13-Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 48: 839-852 (2001)
- 14-Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement M100-S16 CLSI Pennsylvania, USA (2006)
- 15-Colodner RW, Rock B, Chazan N, Keller N, Guy W, Sakran R. Raz. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 163–167 (2004)

- 16-Çetinkaya Z, Çiftçi İH, Aktepe OC, Şafak B, Altındış M. Klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg. 19(1): 1-4 (2005)
- 17-Çokça F, Tekeli E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta laktamazların araştırılması. Mikrobiyol Bült. 32: 1-7 (1998)
- 18-Datta P, Thakur A, Mishra B, Gupta V. Prevalence of clinical strains resistant to various beta lactams in a tertiary care hospital in India. Jpn J Infect Dis. 57: 146-149 (2004)
- 19-Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz oranları ANKEM Derg. 19 (2): 84-87 (2005)
- 20-Esen Ş: ESBL'lerin epidemiyolojik özellikleri: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Köksal İ (ed) Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara s. 26-30 (2004)
- 21-Forbes BA, Sahm DF, Weissfield AS. Laboratory methods for detection of antibacterial resistance: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh edition. Mosby ,USA s. 231-235 (2002)
- 22-Galliot O, Maruejouis C, Abachin E. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended spectrum beta lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. J Clin Microbiol. 36: 1357-1360 (1998)
- 23-Gheldre YD, Avesani V, Berhin C, Delmee M and Glupcynski Y. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta lactamases. J Antimicrob Chemother. 52: 591-597 (2003)

- 24-Gülay Z., Amyes SGB., Yuluğ N. Hastane infeksiyonlarından soyutlanan *K.pneumoniae* suşlarının beta laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve beta laktamaz tiplerinin incelenmesi. Mikrobiyol Bült. 30: 1-11 (1996)
- 25-Gülay Z, Biçmen MK, Yuluğ N. Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 12(4): 514-521 (1998)
- 26-Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerini yorumu. Toraks Dergisi. 3(1): 75-88 (2002)
- 27-Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci:2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg. 19(2): 66-77 (2005)
- 28-Gür D. Temel tıptan kliniğe beta laktamazlar. Hacettepe Tıp Derg. 33(2): 102-109. (2002)
- 29-Gür D:GSBL'lerin genel özellikleri ve GSBL tipleri: genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Köksal İ (ed) Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, s. 5-12 (2004)
- 30-Hakkı Bilgehan: *Enterobacteriaceae*: Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Dördüncü baskı. Hakkı Bilgehan(ed) Barış Yayınları, İzmir. S. 436-439 (2004)
- 31-Henshke-Bar-Meir R, Yinnon AM, Rudensky B, Attias D, Schlesinger Y, Raveh D. Assessment of the clinical significance of production of extended spectrum beta lactamases (ESBL) by *Enterobacteriaceae*. Infection. 34: 66-74 (2006)
- 32-Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS and Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potantiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 42: 49-54 (1998)

- 33-Ho PL, Tsang NC, Que TL, Ho M, Yuen KY. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. APMIS. 108: 237-40 (2000)
- 34-Hoşgör M, Özkan F, Yapar N, Tünger A, Özinel MA. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde çift disk sinerji testi ile üç boyutlu yöntemin karşılaştırılması. KLİMİK Derg. 11(2): 59-60 (1998)
- 35-Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 34 (4): 908-91 (1996)
- 36-Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 10: 867-878 (1989)
- 37-Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A.(Güner Söyletir, Çiğdem Bal, Deniz Gür, Ayşe Willke Topçu) Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye, Biomerieux Yayınları (2004)
- 38-Kaçmaz B, Çakır FÖ, Aksoy A. Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz saptanması. ANKEM Derg. 19(3): 125-129 (2005)
- 39-Kaleli İ, Özen N, Şengül M, Cevahir N, Akşit F. Gram negatif bakterilerde genişletilmiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmesi. ANKEM Derg. 12(4): 442-446 (1998)
- 40-Kfoury JNS, Araj GF. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. BMJ. 327: 1209-1913. (2003)

- 41-Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother.* 28 (2): 302-307 (1985)
- 42-Kolar M, Latal T, Cermak P, Bartonikova N, Chmelarova E, Sauer P, Kesselova M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Int J Antimicrob Agent.* (28): 49-53 (2006)
- 43-Köseoglu Ö, Kocagöz S, Gür D, Akova M. Nosocomial bloodstream infections in a Turkish university hospital: study of Gram-negative bacilli and their sensitivity patterns. *Int J Antimicrob Agent.* 17: 477-481 (2001)
- 44-Livermore DM. Beta lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 8: 557-584 (1995)
- 45-Livermore DM, Brown DFJ. Detection of beta-lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother.* 48(1): 59-64 (2001)
- 46-Mac Kenzie FM, Miller CA, Gould IM. Comparison of screening methods for TEM and SHV derived extended spectrum beta lactamase detection. *Clin Microbiol Infect.* 8(11): 715-724 (2002)
- 47-Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of beta lactam resistance. *Antimicrob Agent Chemother.* 30 (1): 1-5 (1986)
- 48-Manchanda V, Singh NP Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *J Antimicrob Chemother.* 51: 415–418 (2003)

- 49-Medeiros AA. Cooperative evolution of mechanisms of beta lactam resistance. Clin Microbiol Infect. 6 (s3): 3-5 (2000)
- 50-Menon T, Bindu T, Kumar CPG, Nalini S, Thirunarayan MA. Comparison of double disc and three dimensional methods to screen for ESBL producers in a tertiary care hospital. Indian J Medical Microb. 2 (2): 117-120 (2006)
- 51-Mumcuoğlu İ, Gündüz D, Baydur H. *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM Derg. 18 (1): 9-11 (2004)
- 52-Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta lactamases (ESBL). Clin Microbiol Infect. 6: 460-463 (2000)
- 53-Paterson DL. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. The Am J Med. 119 (6A): 20-28 (2006)
- 54-Pen C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares P, Ares JL, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agent Chemother. 42(1): 53-58 (1998)
- 55-Pfaller MA, Korten V, Jones RN, Doern GV. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for seven broad spectrum beta lactams in Turkey using the Etest method. Diagn Microbiol Infect Dis. 35: 65-73 (1999)
- 56-Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended spectrum beta lactamases. Clin Infect Dis. 42 (s4): 153-163 (2006)

- 57-Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother.* 33 (8): 1131-1136 (1989)
- 58-Pitout JDD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of double-disk test for the detection of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum and AmpC beta lactamases. *J Clin Microbiol.* 41 (8): 3933-3935 (2003)
- 59-Rahal JJ. Extended-spectrum beta lactamases:how big is the problem? *Clin Microbiol Infect.* 6 (2): 2-6 (2000)
- 60-Rota S, Çırak MY, Kalkancı A, Gökdağ İ, Kuştimur S. Comparison of inhibitor potentiated disk diffusion with double disk synergy test for the detection of extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Turkish J Infect.* 14 (4): 495-498 (2000)
- 61-Sanders CC, Thomson KS, Bradford PA. Problems with detection of beta lactam resistance among nonfastidious Gram negative bacilli. *Infect Dis Clin North America.* 7 (2): 411-423 (1993)
- 62-Schawab MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE, Tenover FC. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in Non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 42 (1): 294-298 (2004)
- 63-Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Prevalance of extended spectrum beta lactamases in nosocomial and outpatients (ambulatory). *Pak J Med Sci.* 19 (3): 187-191 (2003)

- 64-Shahid M, Malik A, Agrawal M, Singhal S. Phenotypic detection of extended spectrum and AmpC beta lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test:comparison with the conventional three-dimensional extract test. J Antimicrob Chemother. 54: 684-687 (2004)
- 65-Simpson IN, Harper PB, O'Callaghan CH. Principal beta lactamases responsible for resistance to beta lactam antibiotics in urinary tract infections. Antimicrob Agent Chemother. 17 (6): 929-936 (1980)
- 66-Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, Meyran M, Morel C, Perez P, Quentin-Noury C, Reverdy ME, Scheftel JM, Rosenbaum M, Rezvani Y. Resistance to cefotaxime and seven other beta lactams in members of family enterobacteriaceae: a 3-year survey in France. Antimicrob Agent Chemother. 36 (8): 1677-1681 (1992)
- 67-Sirot S. Detection of extended spectrum plasmid mediated beta lactamases by disk diffusion. Clin Microbial Infect. 2 (s1): 35-42 (1996)
- 68-Siu LK. Antibiotics:action and resistance in gram negative bacteria. J Microbiol Immunol Infect. 35: 1-11 (2002)
- 69-Steward CD, Rasheed JK , Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. J Clin Microbiol. 39 (8): 2864-2872 (2001)

- 70-Stobberingh EE, Arends J, Hoggkamp-Korstanje JAA, Goessens WHF, Visser MA, Buiting AGM, Debets-Ossenkopp YJ, Ketel RJ, Ogtrop ML, Sabbe LJM, Voorn GP, Winter HLJ, Zeijl JH. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in Dutch Hospitals. *Infection*. 27 (6): 348-354 (1999)
- 71-Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect*. 47 (4): 273-95 (2003)
- 72-Tanır G, Göl N. Antibiyotik direnci. *KLİMİK Derg*. 12 (2): 47-54 (1999)
- 73-Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended spectrum beta lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol*. 37 (12): 4065-4070 (1999)
- 74-Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, Fridkin SK, Jevitt L, McGowan JE. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clinical Microbiol*. 41 (7): 3142-3146 (2003)
- 75-Thomson KS., Meiglo ZA., Pearce GN, Regan TJ. Three-dimensional susceptibility testing of beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 13: 45-54 (1984).
- 76-Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended spectrum beta lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agent Chemother*. 36 (9): 1877-1882 (1992)
- 77-Thomson KS, Moland ES. Version 2000: the new beta lactamases of gram negative bacteria at the dawn of the new millenium. *Microbes and Infection*. 2: 1225-1235 (2000)

78-Thomson KS. Controversies about extended spectrum and Amp-C beta lactamases. Emerg Infect Dis. 7 (2): 333-336 (2001)

79-Turner PJ. Extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis. 41 (4): 273–275 (2005)

80-Vahaboğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L, Dodanlı S, Yıldırım I, Livermore DM, Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from İstanbul, Turkey. J Med Microbiol. 43 (4): 294-9 (1995)

81-Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in a Belgian teaching hospital. J Clin Microbiol. 35 (9): 2191-2197 (1997)

82-Yorgancıgil B. Beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. Turgut Özal Tıp Merk. Derg. 6 (2): 176-182 (1999)

83-Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. Clin Infect Dis. 32 (2): 94–103 (2001)

84-Woods CR. Antimicrobial resistance: mechanisms and strategies. Pediatr Resp Rev. 7: 128-129 (2006)