

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Bülent BAYSAL
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *KLEBSİELLA*
PNEUMONİAE SUŞLARINDA GENİŞ SPEKTRUMLU BETA-
LAKTAMAZ VARLIĞININ SAPTANMASINDA ÜÇ YÖNTEMİN
(ÇİFT DİSK SİNERJİ, KOMBİNE DİSK VE E-TEST)
KARŞILAŞTIRILMASI VE ANTİMİKROBİYAL
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ferhat IŞIK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. E. İnci TUNCER

KONYA - 2007

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi :	3
2. 1. 1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Genel Özellikleri ve Morfolojileri :	3
2. 1. 2. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Biyokimyasal Özellikleri:	3
2. 1. 3. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Antijenik Yapıları:	3
2. 1. 4. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Patogenezi ve Yaptığı Hastalıklar:	4
2. 2. <i>Klebsiella</i> Türleri:	4
2. 2. 1. <i>Klebsiella</i> Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri:	4
2. 2. 2. <i>Klebsiella</i> Genusunun Taksonomisi:	5
2. 2. 3. <i>Klebsiella</i> Türlerinin Ayırımı:	5
2. 2. 4. <i>Klebsiella</i> 'nın Patojenite Faktörleri:	6
2. 2. 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin Yaptığı Hastalıklar:	7
2. 2. 6. <i>Klebsiella</i> Türlerinin Etken Olduğu Nozokomiyal İnfeksiyonlar ve Epidemiyolojik Özellikleri :	8
2. 2. 6. 1. Nozokomiyal İnfeksiyonlarda; ESBL Üreten <i>K. pneumoniae</i> Salgınları:	10
2. 2. 6. 2. Nozokomiyal İnfeksiyonlarda ESBL Üretiminin Yayılması :	10
2. 3. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları :	11
2. 3. 1. Doğal (İntrinsik) Direnç:	12
2. 3. 2. Kazanılmış (Kalıtsal) Direnç:	12
2. 3. 2. 1. Kromozomal Direnç:	12
2. 3. 2. 2. Plazmidlere Bağlı Direnç:	12
2. 3. 2. 3. Tranpozonlara Bağlı Direnç:	13
2. 3. 3. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları:	13
2. 3. 3. 1. B-Laktamaz Enzimleriyle İlacın İnaktivasyonu:	13
2. 3. 3. 2. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması:	14
2. 3. 4. Extended-Spectrum β -laktamazlar (ESBL'ler):	14
2. 3. 4. 1. ESBL'lerin Genel Özellikleri:	16
2. 3. 4. 2. ESBL Tipleri:	17
2. 3. 4. 3. ESBL'lerin Klinik Önemi:	21
2. 3. 4. 4. ESBL Üreten Bakterilerle Gelişen İnfeksiyonlarda Risk Faktörleri:	21
2. 3. 4. 5. ESBL'lerin Laboratuvar Tanı Yöntemleri:	22
3. MATERYAL VE METOD	26
3. 1. Örneklerin İşleme Alınması:	26
3. 2. Suşların İdentifikasyonu:	26
3. 3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Suşlarında ESBL'nin Saptanması :	27
3. 3. 1. ESBL Üretiminin Doğrulama Testleriyle Araştırılması:	27
3. 3. 1. 1. ESBL varlığının Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile Araştırılması:	27
3. 3. 1. 2. ESBL varlığının Kombine Disk (modifiye disk) Sinerji ile Araştırılması:	27
3. 3. 1. 3. ESBL varlığının E-Test Yöntemi ile Araştırılması:	29
3. 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Suşlarında Antimikrobiyal Direnç:	31
3. 5. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38

6. ÖZET	47
7. SUMMARY	48
8. KAYNAKLAR:	49

1.GİRİŞ

Günümüzde bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesindeki en önemli mekanizma beta-laktamaz enzimi üretimidir. Bu enzimlerin görülme sıklıklarının artması (*Klebsiella pneumoniae*'de SHV-1 ve *E.coli*'de ampisilini hidroliz eden TEM-1) ve yeni bakteri türlerine yayılması (*Neisseria gonorrhoeae* ve *Haemophilus influenzae*) sonucu üçüncü kuşak sefalosporinler klinik kullanıma girmiş; çok daha az yan etkileriyle ve geniş spektrumları ile özellikle gram-negatif bakterilerin neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlarda yaygın olarak kullanılmıştır. Bu yaygın kullanım sonucunda bakteri türleri, bu antibiyotiklere karşı yeni β -laktamaz üretimleriyle cevap vermişlerdir. Bu β -laktamazlar, SHV-1, TEM-1, TEM-2 ana β -laktamaz genlerinden mutasyonlarla oluşmuş ve substrat profilleri genişleyerek üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolizleyip, direnç geliştirmişlerdir. Bu β -laktamazlara “Extended Spectrum β -Lactamases” (ESBL) (Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar) denilmiştir. Ancak tanımları konusunda henüz fikir birliği yoktur.

ESBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonlar, günümüzde tedavi başarısızlıklarına yol açmaktadır. Bu suşlar hastane infeksiyonu etkenleri arasında hızla yayılıp, yüksek mortalite, morbidite ve yüksek tedavi maliyetlerine sebep olurlar. ESBL en çok *Klebsiella spp.* daha az oranlarda da diğer *Enterobacteriaceae* cinslerinde bulunmaktadır. Bu bakteriler ESBL genlerini, plazmidler aracılığı ile birbirlerine, diğer suş ve bakterilere aktarırlar. ESBL üreten *Klebsiella* cinsleri, ESBL genlerinin aktarımında başta gelen bakteri grubudur ve hastane infeksiyonlarında etken olarak öne çıktığı görülmektedir.

Klebsiella türleri hastanede yatan hastaların GİS (gastrointestinal sistem) ve nazofarinksinde kolonize olurlar. Böylece hastalarda ve hastane florasında kolayca kolonize olup uzun süre canlı kalırlar. Hastanede yatan hastalara geniş spektrumlu sefalosporinler çok sık kullanılır. GİS'de bulunan *Klebsiella* türleri bu seçici antibiyotik baskısı ile in vivo koşullarda mutasyonlara uğrayarak ESBL üreten suşlar haline gelirler ve ortama hakim olurlar. ESBL üreten genler, plazmidlerle bazende tranpozonlar ve integronlarla bakteriler arasında kolayca yayılırlar. Son yıllarda sık kullanılan antibiyotiklerin büyük bir kısmına dirençli ve ESBL üreten *K.pneumoniae*'nin sebep olduğu çok sayıda hastane infeksiyonu salgınları bildirilmektedir. Hastane kaynaklı infeksiyonların sağaltımında sık kullanılan kinolonlara karşı son yıllarda %30'lara, diğer antibiyotikler için ise %50'lere varan direnç oranları bildirilmektedir.

ESBL üreten suşlar çoklu direnç plazmidleri de taşıyabilmekte, kromozomal direnç görülen bazı antibiyotiklere de direnç göstermektedir. Çoklu direnç, ESBL üretimiyle ilişkilidir. ESBL üretiminden sorumlu plazmidler aminoglikozidler, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfonamid direnç genlerini de taşıdıklarından ESBL üreten suşlar sıklıkla çoğul dirençlidir. Vurgulanması gereken önemli bir nokta da ESBL oluşturan bakterilerin, in vitro duyarlı bulunsalar bile penisilin, sefalosporin ve monobaktamlara 'dirençli' rapor edilmeleri gerekir. Bunun dışında ESBL üreten suşlarla oluşan yaygın infeksiyonlarda karbapenemler dışında kullanılan antibiyotiklerin bakterisidal etkilerini sürdürmediği veya bakterisidal etkilerinin olmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu yüzden ESBL varlığının ve TEM/SHV/CTX-M prevalansının belirlenip, antibiyotik tedavi rejiminin, ESBL üreten suşlarla oluşan hastane ve toplum kökenli infeksiyonları önlemek, yayılmasını engellemek, tedavi maliyetini düşürüp morbitide ve mortaliteyi azaltacak şekilde yeniden düzenlemek çok önemlidir. Bunun için en başta bakterinin ürettiği ESBL enziminin doğru olarak saptanması gereklidir.

ESBL salgılayan suşların saptanması için klavulanik asidin bu enzimlerin aktivitesini inhibe etmesi temeline dayanan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. ESBL saptanmasında kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleride değişmektedir. Standart disk difüzyon testleri ESBL üretimini %48 oranında yakalayabilmektedir. Bu nedenle bu enzimleri tespit etmek için ilave testlere ihtiyaç vardır. ESBL üretimini belirlemek için en sık uygulanan test çift disk sinerji testi (ÇDST)'dir. Bu testin optimal disk uzaklığı konusunda tam bir standardizasyon maalesef bulunmamaktadır. Bu yöntemin yanında ESBL üretiminin doğru olarak saptanmasında; kombine disk, E test ve otomatize sistemler bulunmasına rağmen bu testlerin rutinde kullanıma girmesi için birbirlerine avantaj, dezavantaj ve yeterliliklerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Araştırmamızda Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastaların kan kültürlerinden dolaşım sistemi infeksiyon etkeni olarak izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında ESBL varlığının tespitinde çift disk sinerji testi ve ESBL E-test yönteminin, CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine (modifiye) disk difüzyon testine göre spesifikliğin ve sensitivitesinin belirlenmesi ayrıca ESBL pozitif bu suşların diğer antibiyotiklere duyarlılık oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle hastanemizde *K.pneumoniae* suşlarında ESBL oranlarını belirleyip, ESBL belirlenmesinde gerek duyarlılığı gerekse ekonomikliği açısından en uygun yöntemi tespit edip bu bakterilere karşı hastanemizin antibiyotik stratejisini belirlemek için bu çalışma yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. *Enterobacteriaceae* Ailesi :

Enterobacteriaceae üyesi bakteriler gram negatif, çoğu hareketli, fakültatif anaerop basillerdir. Bu aile şu an yaklaşık 100 tür içermektedir (1).

2. 1. 1. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Genel Özellikleri ve Morfolojileri :

Enterobakteriler küçük 0.5-3 µm en ve 1-6 µm boyunda, gram-negatif, sporsuz basillerdir. Enterobakterilerde, *Klebsiella* cinsinde olduğu gibi kalın, belirgin bir kapsül veya slime tabakası denen ince bir kılıf hücreyi sarabilir (2). *Enterobacteriaceae* türleri Mac Conkey besiyerinde kolay üreyen basillerdir. Bazıları peritriş kirpiklerle hareketli veya hareketsiz, DNA'da Guanin+Sitozin (G+C) oranı %39-59 arasındadır. Bu ailede yer alan *K.pneumoniae* yaşadığımız çevrede çok yaygındır. *K.pneumoniae* insanların barsaklarında, üriner sistem ve solunum sisteminde belirtisiz yerleşim gösterebildiği gibi, ölüme kadar giden ağır infeksiyonlar da oluşturabilir (3).

2. 1. 2. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Biyokimyasal Özellikleri:

Bu ailedeki bakteriler, glikozu fermente eden, nitratı redüksiyona uğratabilen, katalaz pozitif, oksidaz negatif özelliğe sahiptirler. *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinsleri glikoz fermentasyonunda farklı olarak butanediol yolunu kullanırlar ve son ürün olarak aseton oluştururlar. Bu nedenle *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinslerinin Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif olup, IMVC testi (- - + +) dir.

2. 1. 3. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Antijenik Yapıları:

Somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri, ailenin serolojik tiplendirmesinde kullanılan ana antijenlerdir. Bunlar dışında bakteri hücresinin dış yüzeyinde bulunan ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen) tüm enterobakterilerde bulunan ortak antijendir. Somatik (O) antijeni; O antijeninin birinci bölgesi (region I) tekrarlayan oligasakkarit parçalarından oluşur. İkinci bölge (region II) kor polisakkaritinden oluşur. Lipit A bölümü yani üçüncü bölge (region III) beş altı yağ asidine tutunmuş bir disakkarittir. O antijenleri ısıya (110°C ye 2.5 saat), alkole (%96'lık, 4 saat) ve asitlere dayanıklıdır. Formaldehit

karşısında etkinliği kaybolur. Kirpik (H) antijenleri; protein yapıdadır. Hareketli suşlarda bulunur. Formole dirençlidir. K (kapsül) antijeni; polisakkarit yapıda olup, antijenik özellik taşır.

2. 1. 4. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Patogenezi ve Yaptığı Hastalıklar:

Protein yapıda adezinlerin görevi, bakterinin mukozalara tutunmalarını sağlamaktır. Bakterinin Lipid A bölümü toksik aktiviteden sorumludur. Enterotoksinleri ise genellikle ince barsakları etkileyip diyareye neden olan toksinlerdir. Enterobakteriler demir sağlamak için, siderofor denilen bileşikleri kullanarak konak organizmada transferrin veya laktoferrin gibi moleküllerden demir kazanırlar. Bunlara ek olarak shigatoksin ve shigatoksin benzeri toksinler, hemolizinler, kapsül maddeleri, enzimler diğer virülans faktörleridir. Kolonizasyon faktörleri, enterotoksin, hemolizin gibi virülans faktörlerini ve ilaç direnci genlerini taşıyan plazmidler ve bakteriyosinler de bulunur.

Enterobakteriler GİS dışındaki yerleştiği yerlerde önemli infeksiyonlar yapabilirler. En sık üriner sistem infeksiyonları görülür. Bunun dışında solunum sistemi, yara, kan ve merkezi sinir sisteminde, pnömoni, septisemi, menenjit ve abselere neden olurlar (2, 3).

Bu ailede tipik semptomlarla seyreden hastalıkların (tifo, basilli dizanteri, veba) etkeni olan cinsler ile, özellikle hastane infeksiyonlarına (idrar yolu yara infeksiyonları, pnömoniler, septisemiler) neden olan fırsatçı bakteriler bulunmaktadır (4).

Aslında bugün enterobakteriler hastane infeksiyonlarının en büyük sorumlularıdır. Hastane infeksiyonlarına yol açan enterobakteriler; *E.coli*, *Enterobacter spp*, *K.pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter spp*. ve *Serratia marcescens* türleridir (3).

2. 2. *Klebsiella* Türleri:

2. 2. 1. *Klebsiella* Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri:

Klebsiella'lar gram-negatif, sporsuz, hareketsiz, kapsüllü basillerdir. *Klebsiella* cinsleri üreyi hidrolize ederler. H₂S yapmaz, fenilalanini deamine etmezler. İndol negatif (*K.oxytoca* hariç) ve metil kırmızısı reaksiyonu negatif, Voges-Proskauer, sitrat testleri ve laktoz pozitifdir. *Klebsiella* diğer enterik bakterilerden farklı olarak belirgin bir kapsüle sahip olup, besiyerlerinde geniş, M tipi mukoid koloni yaparlar (4).

2. 2. 2. *Klebsiella* Genusunun Taksonomisi:

Tıbbi öneme sahip *Klebsiella* türleri yaptıkları hastalıklara göre *K.pneumoniae*, *K.ozoena*, *K.rhinoscleromatis* şeklinde 3'e ayrılmıştır. Zaman içinde 3 ana klasifikasyon ortaya konmuştur (Cowan, Bascomb ve Orskov) (Tablo1).

Tablo 1. *Klebsiella* Genusunun Farklı Taksonomik Sistemlere Göre Tür Sınıflandırılması (5)

Cowan	Bascomb	Orskov
<i>K.aerogenes</i>	<i>K.aerogenes/oxytoca/edwardsii</i>	<i>K.pneumoniae</i> <i>subsp. Pneumoniae</i> <i>subsp. Ozaenae</i> <i>subsp. Rhinoscleromatis</i>
<i>K.edwardsii</i> <i>subsp. Edwardsii</i> <i>subsp. Atlantae</i>	<i>K.pneumoniae</i> <i>sensu stricto</i> <i>sensu lato</i>	<i>K.oxytoca</i>
<i>K.pneumoniae</i>		
<i>K.ozoenae</i>	<i>K.ozoenae</i>	<i>K.terrigana</i>
<i>K.rhinoscleromatis</i>	<i>K.rhinoscleromatis</i> <i>K. 'isimlendirilmeyen grup'</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K.planticola</i>

1980'lerin başlarında daha önce *Klebsiella* benzeri mikroorganizmalar olarak adlandırılan çevreden elde edilen *Klebsiella* izolatları, geçici olarak taksonomide yer almaya başlamışlardır (J, K, L, M grupları). Bu gruplar 4 yeni türün ortaya çıkmasına neden olmuştur. *K.terrigana*, *K.ornithinolytica*, *K.planticola* ve *K. trevasanii*. 1986 yılında son iki tür DNA yapısındaki benzerlik nedeniyle tek bir tür içinde (*K.planticola*) birleştirilmiştir (5). *K.planticola*'nın *Klebsiella* türlerinin klinik izolatları arasında %3.5-18.5 gibi yüksek bir orana sahip oldukları gözlenmiştir (6).

2. 2. 3. *Klebsiella* Türlerinin Ayırımı:

Klebsiella türleri lizin dekarboksilaz pozitif, ornitin dekarboksilaz negatifliği ile diğer enterobakterilerden ayrılır. *Klebsiella*'ların biyotiplendirilmesi, klasik biyokimyasal testlerle veya API 32E gibi ticari sistemlerle yapılabilir (Tablo 2).

Serotiplendirme ise asıl olarak kapsül antijeninin tespitine dayanır. Genellikle iyi gelişmiş polisakkarid kapsülüne sahip olan *Klebsiella*'ların 82 tip kapsül antijeni tanımlanmıştır. Bunlardan 77'si uluslararası kapsül antijen şemasının temelini oluşturmaktadır. Kapsül tiplendirme, biyokimyasal tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme, moleküler tiplendirme ve faj tiplendirmesi tek başına özel koşullar dışında epidemiyolojik araştırma için yeterli değildir. Biotiplendirme ile kapsül tiplendirmenin kombine kullanımı, çok sayıda biyotipin ayrımını sağlamaktadır (5-7).

Tablo 2. Klebsiella Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları (6)

Özellikler	<i>K.pneumoniae subsp.</i>			<i>K.oxytoca</i>	<i>K.terrigana</i>	<i>K.planticola</i>	<i>K.ornithinolytica</i>
	<i>Pneumoniae</i>	<i>Ozaneae</i>	<i>Rhinoscleromatis</i>				
İndol	-	-	-	+	-	D	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+	+
Pektat degranülasyon	-	-	-	+	-	-	-
Laktozdan gaz oluşumu	+	-	-	-	-	-	-
10°C'de üreme	-	-	-	+	+	+	+
D- melezitozdan asit oluşumu	-	-	-	D	+	-	-
L-sorbozdan asit oluşumu	D			+	+	+	
m-hidroksibenzoat oluşumu	-	-	-	+	+	-	-
Hidroksi-L-prolin oluşumu	D			D	D	+	
Malonat oluşumu	+	-	+	+	+	+	+
Metil kırmızı testi	-	+	+	-	+	D	+
Voges-Proskauer testi	+	-	-	+	+	+	+

(D) Değişken, (+) Pozitif, (-) Negatif

2. 2. 4. *Klebsiella*'nın Patogenite Faktörleri:

1-Kapsüller Antijenler: Kapsüller yapı *Klebsiella*'nın virulansında temeldir. *Klebsiella* kapsül polisakkaritlerinin in vitro olarak makrofajların fonksiyonel kapasitelerini ve

farklılaşmalarını engelledikleri rapor edilmiştir. K2 suşu dünya çapında klinik izolatlar arasında en çok görülen izolat iken çevreden en nadir izole edilen suştur.

2-Genel Pili (Tip 1): Bu yapılar 10 µm boyunda 1-11 nm çapında olup 15-26 kDa moleküler ağırlığında polimerik globuler protein alt ünitelerinden (pilin) oluşmaktadır. Tip1 pililerin bakterinin ürogenital ve solunum sistemine kolonizasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (5).

3-Tip 3 Pili: Diğer fimbrialardan farklı olarak sadece tanen ile muamele edilmiş olan eritrositi aglutine ederler (5). Tip 3 pili, *K.pneumoniae* suşlarının endotelial hücrelere, solunum sisteminin epiteline ve üroepitelial hücrelere yapışmasında rol alır (7). Kısa zaman önce 3 yeni *Klebsiella* adezini rapor edilmiştir (8).

4-Serum Direnci ve Lipopolisakkarit: Serum direncinden TraT lipoproteini veya porini gibi dış membranın çeşitli proteinlerinin asitleri, kapsüler polisakkarit (CPS) ve O antijenlerinin (lipopolisakkaritler)sorumlu olduğu ortaya konmuştur (5).

5-Sideroforlar: Demir bakterinin üremesi için redoks katalizörü olarak görev yapan temel faktördür. Demir intrasellüler olarak hemoglobulin, ferritin, hemosiderin, myoglobulin ve ekstrasellüler olarak transferin gibi proteinlere bağlıdır. Birçok bakteri konakta ihtiyacı olan demiri siderofor adı verilen yüksek duyarlılık, düşük molekül ağırlıklı şelatlar ile sağlarlar (5).

2. 2. 5. *Klebsiella pneumoniae*'nin Yaptığı Hastalıklar:

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda %5-10 oranında *K.pneumoniae* bulunur. *K.pneumoniae* (Friedlander basili) hem hastane ortamından hem de toplumdan kazanılan tipik lobar pnömoni oluşturmaya rağmen fırsatçı infeksiyon etkeni olarak değerlendirilir. *K.pneumoniae*, pnömoniden başka üriner yol, yara infeksiyonlarına ve bakteremilere yol açar. Yeni Doğan Ünitelerinde plazmid aracılı çoklu dirençli *Klebsiella*'lara bağlı hastane infeksiyonları sık görülür.

Klebsiella'ların klinik açıdan önemli özellikleri ESBL üretmeleri ve çoklu antibiyotik direncine sahip olmalarıdır. *K.pneumoniae* dışındaki *Klebsiella* türleri daha az oranda hastane infeksiyonlarına yol açar (2).

2. 2. 6. *Klebsiella* Türlerinin Etken Olduğu Nozokomiyal İnfeksiyonlar ve Epidemiyolojik Özellikleri :

Hastane infeksiyonları (nozokomiyal infeksiyonlar, Hİ), hastaneye başvuru anında inkübasyon döneminde olmayan, hastaların hastaneye başvurularından 48-72 saat sonra gelişen ya da hastanede gelişmesine karşın, bazen hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkabilen infeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Değişik çalışmalarda, Hİ'lerinin görülme sıklığının %3.1-14.1 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Hİ'ü etkenleri ve direnç profilleri ülkeler arasında, hastaneler arasında ve hatta aynı hastanenin değişik birimleri arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir (9-11).

Üriner sistem infeksiyonları, %40 görülme sıklığı ile en sık görülen nozokomiyal infeksiyonlardır (12). Nozokomiyal pnömoni, tüm nozokomiyal infeksiyonların %13-18'inden sorumludur (13). Nozokomiyal infeksiyonlar arasında en ağır klinik tablolardan biri nozokomiyal bakteremilerdir. Özellikle fazla sayıda invaziv girişimlerin yapıldığı yoğun bakım birimlerinde görülme sıklığı daha fazladır. Bakteremi tanısı kan kültürü pozitifliğiyle konur (14). Bu infeksiyonları diğer alt solunum yolu infeksiyonları ve cerrahi alan infeksiyonları izler. Ülkemizde sürveyans yapılan az sayıda hastanede nozokomiyal infeksiyon oranları %5 civarında saptanmıştır. Bu infeksiyonların kaynağı kişinin kendi kolon florası (endojen) ve hastane personelinin elleri (ekzojen) olabilmektedir (10).

Epidemik Hİ'ları, Hİ'lerinin %10'unu oluşturmaktadır. Endemik Hİ'ları ise, olguların %90'ını oluşturmakta ve sporadik olarak gözlenmektedir (15). Hastane infeksiyonlarından izole edilen patojenlerin spektrumu süreç içinde değişmekle beraber gram-negatif bakteriler, hastanede sorun olan patojenler içindeki yerini korumaktadır (16).

Avrupa'da 1992'de 13 ülkede hematoloji/onkoloji ve yoğun bakım birimlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada hastane infeksiyonlarından soyutlanan 8625 bakterinin %57'sini gram-negatif basillerin oluşturduğu görülmüştür (17). Ülkemizde 1994-1995 yıllarında 8 merkezde yoğun bakım birimlerinde gerçekleştirilen NPRS (National Prevalence Resistance Study) çalışmasında izole edilen 981 gram-negatif bakterilerin dağılımı incelendiğinde ilk sırada *Pseudomonas spp.* (%30) saptanmış, onu *Klebsiella spp.* (%25), *E.coli* (%18), *Acinetobacter spp.* (%9), *Enterobacter spp.* (%9) izlemiştir (18).

Hospitalize edilmiş ve diabetes mellitus veya kronik pulmoner obstrüksiyonlu immünkompromize bireylerde, fırsatçı patojen olan *Klebsiella* türlerinin yaptığı infeksiyonlara sık rastlanmaktadır. *K.pneumoniae* nozokomiyal infeksiyonların en önemli etkenlerindendir. ABD ve Avrupa'da, *Klebsiella* türleri nozokomiyal bakteriyel

infeksiyonların %8'inin nedenidir. İngiltere'de 1983-1991 yılları arasında görülen 145 epidemik nozokomiyal infeksiyonların 13'ünün nedeninin *Klebsiella* olduğu bildirilmiştir. *Klebsiella* türleri endemik hastane infeksiyonlarının %8'inden, epidemik salgınların ise %3'ünden sorumludur (5, 6, 19). Son yıllarda *K.pneumoniae* yaptığı infeksiyonlardan daha çok ESBL üretilmesiyle ortaya çıkan dirençleriyle gündeme gelmiştir. Başlıca β -laktam antibiyotiklerle beraber aminoglikozidlere, florokinolonlara da direnç gösteren çoklu dirençli bakterilerin sayısı artmıştır. Ayrıca çok yaygın olmasa da karbapenem direnci gelişmeye başlamıştır (16).

Klebsiella'lar sağlıklı bireylerin nazofarinks ve barsağında % 5 oranında kolonize olurlar. Antibakteriyel ilaç kullanımı ve hospitalizasyon *Klebsiella* taşıyıcılığını arttırmaktadır. *Klebsiella* infeksiyonlarına ortamda kolonize olmuş suşlar kaynak oluşturmaktadır. Florada sınırlı sayıda *Klebsiella* suşu bulunmasına karşılık hastanelerde yatarak tedavi alan hastalarda kolonizasyon oranlarının hızla arttığı bilinmektedir (20). Yapılan çalışmalarda hospitalize hastalardaki taşıyıcılık oranları, gaitada %77, farinkste %19, hastaların ellerinde ise %42 oranında bulunmuştur. Yüksek orandaki nozokomiyal *Klebsiella* kolonizasyonunun daha çok antibiyotik kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Başka bir çalışmada hastanede iki haftalık bir kalış süresinden sonra *Klebsiella* kolonizasyon oranında 2-4 kat artış saptanmıştır (6). Kolonizasyonun artışı ve hastanedeki *Klebsiella* suşlarına karşı çoklu direncin görülmesi, özellikle uzun süreli, çoklu veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlanmaktadır (21). Kontrollü antibiyotik kullanımı ile bu tür istenmeyen etkiler azalacağından profilaksi ve ampirik tedavi amaçlı yanlış antibiyotik kullanımını engelleyecek yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekir. Kan ürünleri, medikal aletlerin kontaminasyonu, hastaların GİS'leri ile hastane personelinin elleri infeksiyonun yayılmasında önemli kaynaklardır (6).

Avrupa'da *Klebsiella* suşlarının β -laktamazları genellikle SHV-5 tipi iken ABD'de TEM-10 ve TEM-12 daha yaygın olarak görülmektedir (6). 1993'te "National Nosocomial Infection Study System"de test edilen, *K.pneumoniae* suşlarının %5'inin ESBL pozitif izolatlar olduğu rapor edilmiştir (22). Avrupa'da ise bu oran daha yüksektir. 2000 yılında Fransa ve İngiltere'de yapılan bir çalışmada *Klebsiella* suşlarının %14-16'sının ESBL üreten suşlar olduğu ortaya konmuştur (6). Belirgin bölge ve hastanelerde bu oran %25-40'a ulaşabilmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *K.pneumoniae* suşlarında ESBL sıklığı %40-90 arasında değişmektedir (23).

ESBL'ler genellikle plazmid kaynaklıdır. Bu plazmidler, enterobakterilerin çeşitli türleri arasında kolay geçiş gösterebildiklerinden dirençli genlerin birikimi, çoklu direnç

plazmidleri içeren suşlarla sonlanmaktadır. ESBL üretimi sıklıkla antibiyotiklere karşı çoklu direnç ile ilişkilendirildiğinden, terapötik seçenekler sınırlı hale gelmiştir. Bununla birlikte, ESBL üreten *Klebsiella* suşlarının karbapenemlere duyarlı olduğu görülmektedir. Ancak imipeneme direnç gösteren ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşları izole edilmiştir. Bu suşların plazmid kaynaklı AmpC-tip β -laktamaza sahip oldukları bilinmektedir (24).

2. 2. 6. 1. Nozokomiyal İnfeksiyonlarda; ESBL Üreten *K.pneumoniae* Salgınları:

ESBL üreten klinik izolatların çoğunu hastanede yatan hastalardan izole edilen ve en çok nozokomiyal salgın sebebi olan *K.pneumoniae* suşları oluşturmaktadır (25). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde ESBL üreticisi *K.pneumoniae* suşlarının neden olduğu büyük hastane salgınları gözlenmiştir. Bu salgınlarda gelişen infeksiyonların yaklaşık yarısının kan dolaşımı infeksiyonu olduğu bildirilmiştir (26). Ülkemiz hastanelerinde de nozokomiyal patojen olan *Klebsiella* suşlarının ESBL üretiminin %80'leri geçtiği gözlenmektedir (27).

Ampisiline karşı primer dirençten dolayı ampisilin yada aynı spektrumdaki başka ilaçla tedavi edilen hastalarda florada *E.coli*'nin yerini *Klebsiella* türleri almaktadır. Yine üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımı, ESBL pozitif *Klebsiella* türlerinin kolonize olması ve infeksiyon oluşturmada oldukça önemli bir risk faktörüdür (28).

2. 2. 6. 2 Nozokomiyal İnfeksiyonlarda ESBL Üretiminin Yayılması :

Hastaneler, sıklıkla kullanılan invaziv tanı ve tedavi uygulamaları, yüksek antibiyotik kullanım oranları gibi nedenlerle dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması için uygun ortamlardır. İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ampirik antibiyotik kullanımı ve antibiyotik duyarlılık testleri için önemli bir sorun olan standardizasyon eksikliği ne yazık ki direnç gelişmesine ciddi katkıda bulunmaktadır (20).

Klebsiella spp. kapsülü sayesinde kuruluğa daha dirençlidir bu sayede cilt ve eşyalar üzerinde uzun süre kalıp çapraz infeksiyonlara neden olurlar. Bir hastanede ESBL üreten bir suş seleksiyonla seçilebilir veya başka bir merkezden transfer edilebilir. Bundan sonra bu suş değişik yollarla yayılabilir veya ESBL'yi kodlayan plazmid farklı suşlar arasında transfer edilerek yayılabilir. ESBL taşıyan plazmidler 100 kb ve daha büyük plazmidlerdir. ESBL genlerini taşıyan genler aynı zamanda aminoglikozid direncini kodlayan genleri de taşır. Bir çok merkezde bu plazmidlerin yayılması veya klonun

yayılması ile oluşan ESBL salgınları bildirilmektedir (29). Her merkezde periyodik olarak antimikrobiyal direncin izlenmesi ve sonuçlarının bildirilmesi, uygun tedaviye ve direnç gelişiminin önlenmesine katkıda bulunacaktır (20).

Sonuç olarak; *Klebsiella*'lar fırsatçı infeksiyonlar olup septisemi, pnömoni, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonu gibi ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedir. *Klebsiella* infeksiyonları tipik olarak nozokomiyal infeksiyonlardır. Bu bakterilerin hedefleri hospitalize edilmiş, altta yatan başka bir hastalığı olan immün yetmezlikli hastalardır. *Klebsiella* infeksiyonları yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde septisemi ve menenjitlere neden olabilmektedir. Bu salgınların daha fazlasının nedeni çoklu antibiyotiğe dirençli suşlar olduğundan, yeni doğan *Klebsiella* infeksiyonları büyük sorun haline gelmiştir. Çoklu dirençli *Klebsiella* suşlarının hastane salgınlarından ESBL suşları sorumlu tutulmaktadır. *Klebsiella* suşları arasında, ESBL oluşturan suşların sayısında geçmiş yıllara göre sürekli bir artış göstermektedir (5).

Klinikte ESBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde karbapenemler, kısmen β -laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar ve sefamisinler kullanılmaktadır. Artık dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepimin kullanılması da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilmemektedir (30).

Risk altındaki kişilerin nozokomiyal *K.pneumoniae* infeksiyonlarından korunması için aşı çalışmaları yapılmıştır. Günümüzde *Klebsiella* izolatlarının kapsül tiplerinin yaklaşık 25 serotipini içeren *Klebsiella* aşılı, bu bakterinin neden olduğu sepsisten korunmada en geçerli aşı olarak kabul edilmektedir (31).

2. 3. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları :

Bakteriler tranpozon ve plazmidler gibi hareketli genetik parçaları alarak, basit mutasyonlar ile veya endojen antibiyotik direnç odaklarının yeniden düzenlenmesi (rearrangement) ile (integronlar gibi) antibiyotiğe dirençli hale gelirler. ABD'de hastane kaynaklı infeksiyonların %70'inden antibiyotiklere dirençli bakteriler sorumludur (32).

Dirençte yeni bir mutasyon veya direnç geninin kazanılma olasılığı nedeniyle genetik metodlar %100 duyarlılık sağlamaz, bu nedenle klasik yöntemler uygulamada terk edilmemelidir. Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (kalıtsal) direnç diye iki ana bölümde ele alınabilir (33).

2. 3. 1. Doğal (İntrinsik) Direnç:

Bir organizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu anlamına gelir. Antimikrobik maddenin etkili olduğu hedef molekülün olmaması ve ilacın hedefe ulaşmasını önleyen doğal engeller bu tip dirençten sorumludur. İlaçların etkili olması için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekir. Bakteri sporları veya dormant haldeki mikobakteriler gibi inaktif mikroorganizmalar dirençli görülebilir, ama bunlardan oluşan yeni kökenler ilaçlara duyarlıdır. Bir çok gram-negatif bakteri vankomisin ve metisiline, enterokoklar sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle intrinsik direnç gösterirler. Zorunlu anaerop bakterilerde ilaç hücre içine giremediğinden aminoglikozidler etki göstermezler.

2. 3. 2. Kazanılmış (Kalıtsal) Direnç:

Kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakterilere antimikrobik madde ilk temasta etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında antimikrobik maddeye karşı direnç gelişir. Antimikrobiklere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç kromozom, plazmid, tranpozon kontrolü altındadır.

2. 3. 2. 1. Kromozomal Direnç:

Bu tip direnç kromozomda kendiliğinden (spontan) bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Her hücre bölünmesinde mutasyon sıklığı 10^{-5} ile 10^{-10} civarındadır. Kromozomal mutasyonla gelişen direnç başka türden bakterilere yayılmadığından ve mutasyona uğrayan bakterinin metabolizması da değişebilip üremesi kısıtlanabileceğinden dolayı plazmidle oluşan dirence göre daha seyrek görülür.

2. 3. 2. 2. Plazmidlere Bağlı Direnç:

Klinikte görülen direncin ana sorumlusudur. R-plazmidi denen direnç plazmidleri bir veya daha çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşımaktadır. Normal barsak florasında anaerop koşullarda plazmid transferi inhibe edilir, bu nedenle normal barsak florası, R-plazmidlerine karşı en iyi savunma mekanizmasıdır.

2. 3. 2. 3. Tranpozonlara Bağlı Direnç:

Tranpozonlar bir DNA molekülünden diğerine (kromozomdan plazmide, plazmidden kromozoma) geçebilen DNA dizileridir, bağımsız olarak replike olamazlar. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklinler ve trimetoprim karşı direnç gelişiminden sorumludur. Özellikle çok kısa sürede çoklu ilaç dirençli (multiple-drug resistance) kökenlerin ortaya çıkıp yayılışında tranpozonların rolü vardır. R-plazmidleri ve tranpozonların etkisiyle; antimikrobik maddeyi parçalayan enzim oluşturulması, hücre çeperi geçirgenliğinin bozulması, ilacın hücreden dışarı atılması, ilacın ortamdaki alınışının azalması, ilacın hücre içindeki etki yerine bağlanmasının azalması sonucu direnç gelişir.

2. 3. 3. Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları:

β -laktam antibiyotiklere direnç üç yolla gelişir: 1) PBP'lerde oluşan değişiklik sonucu antibiyotik hedefine bağlanamaz. 2) β -laktamaz enzimleriyle ilacın inaktivasyonu. 3) Dış membran proteinlerinde (Outer Membrane Protein, OMP) oluşan değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girememesi. Gram-negatif bakterilerde direnç her üç mekanizma ile gelişirken, Gram-pozitif bakterilerde dış membran olmadığından direnç ilk iki mekanizma ile gelişir (33).

2. 3. 3. 1. β -Laktamaz Enzimleriyle İlacın İnaktivasyonu:

β -laktamlar, peptidoglikan sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak etki gösterir (34). Ancak bakterisidal etkileri, bakteriyel otolizinlerin aktive olmasına bağlıdır (35). β -laktamazlar, β -laktamların etkisini siklik amid bağı parçalayarak yok eden enzimlerdir (34). β -laktam antibiyotiklere karşı klinikte görülen direncin en sık nedenidir. β -laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, tranpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir. Günümüzde birçok gram-negatif, gram-pozitif bakteri türü ve mikobakterilerde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından farklı 400'den fazla β -laktamaz tanımlanmıştır (36). β -laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bunların yaklaşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu β -laktamazdır (ESBL) (37).

2. 3. 3. 2. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması:

En çok Bush-Jacoby-Medeiros veya Ambler sınıflandırmaları kullanılır. Bush-Jacoby- Medeiros β -laktamazları penisilin, oksasilin, karbenisilin, sefaloridin, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve imipeneme karşı hidrolitik spektrumları ve klavulanik aside (CA) duyarlılıklarını esas alarak dört grup ve bazı alt gruplarda toplamışlardır (38, 39). Grup-1, moleküler sınıf C'ye ait, CA tarafından inhibe edilemez sefalosporinazlardan oluşur. Grup-2, moleküler sınıf A ve D'ye aittir. 2a alt grubu, sadece penisilinazları içerirken, 2b ise; sefalosporinleri de inaktive eder. 2be alt grubunda "e" harfi genişlemiş anlamına gelir. 2br; inhibitörlere dirençli (IRT) TEM türevidir. CA ve sulbaktama dirençli, tazobaktamlara duyarlıdır. 2c; karbenisilini, benzilpenisilinden, 2d; oksasilini, benzilpenisilinden daha çok hidrolize eder. CA ile az inhibe olur. 2e; monobaktamları da hidrolize eden sefalosporinazlardır. 2f; serin içeren karbapenemazlardır. Grup-3, çinko bazlı metallo- β -laktamazlar, moleküler sınıf B'ye aittir. Grup-4, CA ile inhibe olmayan penisilinazlardır. Moleküler sınıfı yoktur. β -laktamaz grupları ve genel özellikleri Tablo-3'te gösterilmiştir (40, 41).

2. 3. 4. Extended-Spectrum β -Laktamazlar (ESBL'ler):

ESBL'ler ilk olarak 1980'li yıllarda geniş spektrumlu sefalosporinlerin geliştirilmesinden kısa bir süre sonra hastane infeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* suşlarında saptanmış, *Klebsiella spp.* ve *E.coli'* lerde daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella spp.* ve *Shigella flexneri* de dahil bir çok enterik bakteride bildirilmiştir (42). Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolizleyebilen plazmid aracılı β -laktamazların ilk raporu 1983 yılında yayınlanmıştır. ESBL'nin tam tanımı hakkında bir görüş birliği yoktur. Yaygın kullanılan tanım; klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilen, penisilin, 1, 2. ve 3. jenerasyon sefalosporinler ve aztreonama karşı direnç gösterebilen β -laktamazlardır (43). Sefalosporinlere direnç önce indüklenabilir kromozomal AmpC β -laktamazların aşırı senteziyle ortaya çıkmış, daha sonra AmpC içermeyen *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Salmonella spp* ve *Proteus mirabilis* gibi bakterilerde ESBL'ler tanımlanmıştır. β -laktamaz inhibitörlü kombinasyonların kullanıma girmesinden sonra plazmid kontrolünde AmpC β -laktamazları sentezleyen bakteriler gözlenmeye başlanmıştır (44).

Tablo-3. β -Laktamaz Grupları ve Genel Özellikleri (38-41)

β -laktamaz grubu	Alt grup	Molekül sınıfı	Özellik	Substrat	Örnek enzimler
1		C	Çoğunlukla gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler ancak plazmidde de kodlanabilir. Karbapenemler dışında tüm β -laktamlara direnç oluşturur. Klavulanik asit (CA) ile inhibe olmaz.	Sefalosporinler	Gram-negatif bakterilerdeki AmpC enzimleri: MIR-1
2	2a	A	CA ile inhibe olurlar.	Penisilinler	Stafilokok, Enterokoklar daki penisilinazlar
	2b	A	CA ile inhibe olurlar.	Sefalosporinler penisilinler	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	ESBL'ler CA ile inhibe olurlar	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	TEM-3 ila TEM-26, SHV-2 ila SHV-6
	2br	A	İnhibitörlere dirençli (IRT) β -laktamazlar. CA ile az (+/-) inhibe olurlar.	Penisilinler	TEM-30 ila TEM-36, TRC-1
	2c	A	Karbenisilini hidrolize eden enzimler. CA ile inhibe olurlar	Penisilinler, karbenisilin	PSE-1, PSE-3, PSE-4
	2d	D	CA ile az (+/-) inhibe olurlar.	Penisilinler, kloksasilin	OXA-1 ila OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
	2e	A	CA ile inhibe olan Sefalosporinazlar	Sefalosporinler	<i>P. vulgaris</i> 'in indüklenabilir Sefalosporinazları.
	2f	A	Aktif bölgede serin içeren karbapenemazlar.	Sefalosporinler penisilinler, karbapenemler	<i>E. cloacae</i> 'nin NMCA'sı, <i>S.marcescens</i> 'in Sme-1'i.
3		B	CA ile inhibe olmazlar. Metallo- β -laktamazlar	Bir çok β -laktam, karbapenemler dahil	<i>S. maltophilia</i> 'nin L1'i, <i>B.fragilis</i> 'in CcrA'sı
4		?	Dizileri belirlenmemiş enzimler	Penisilinler	<i>P. cepacia</i> 'nin penisilinazı

CA: Klavulanik Asit

2. 3. 4. 1. ESBL'lerin Genel Özellikleri:

ESBL'ler geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikleri hidrolize edebilmelerini sağlayan mutasyonları içerirken, mutasyonlarla oluşan aktif bölgelerindeki bu genişleme; ESBL'lerin β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarının da artmasına yol açmıştır. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörleri, ESBL etkisini bloke etmekte, bu yüzden de sıklıkla β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına duyarlıdırlar (45, 46).

ESBL'lerin büyük çoğunluğu TEM veya SHV enzimlerinden köken almıştır. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi β -laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu enzimlerdir. Bunlar penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde geniş spektrumlu β -laktamlara sınırlı etki gösterirler veya etkisizdirler. *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygındırlar. Oksiimino β -laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 ana enzimlerinin aktif bölgelerinden 1-7 aminoasit değişikliği ile oluşan ESBL'ler; sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksiimino sefalosporinleri benzilpenisiline eşit veya %10 daha fazla hidrolize edebilen, aktif bölgelerinde serin bulunan β -laktamaz enzimleridir. Buna karşın, bazı aminoasit değişiklikleri ESBL'lere farklı substrat özgülüğü sağlamaktadır. Örneğin; TEM-3, TEM-4, SHV-4, SHV-5 gibi bazı enzimlerin sefotaksim ve seftazidim için hidroliz hızları eşittir. Buna karşın, seftazidimaz fenotipi gösteren bazı β -laktamazlar seftazidimi diğer sefalosporinlere oranla daha hızlı hidrolize etmektedir. Sonuçta ESBL'ler köken aldıkları TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 ana enzimlerinden farklı olarak oksiimino grubu sefalosporin ve monobaktamları hidroliz edebilmektedir. ESBL'ler karbapenemlere ve sefamisinlere (TEM-52, TEM-88 gibi bir iki enzim dışında) aktivite göstermemektedirler. Sefamisinlere etkili olmamaları ESBL'leri AmpC tipi β -laktamazlar dan ayıran önemli karakteristik özellikleridir (36, 47-52).

Bu enzimler biyokimyasal özelliklerin ön planda tutulduğu Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasında grup 2be, 2e ve 2d'de, Ambler sınıflamasında ise sınıf A ve D gruplarına sokulmaktadır (39, 53). Bu enzimlerin geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı hidroliz hızı (V_{max}) ve bağlanma ilgileri (K_m) yüksek olduğundan direnç oluşturma yetenekleri de yüksektir. ESBL'lerin *Klebsiella*'larda yaygın olmasının nedeni kesin olarak belirlenmemiştir. Ancak bu bakterilerde spontan mutasyonların daha sık geliştiği, vücut florasında buldukları için birbirlerine ve diğer bakterilere direnç aktarımını daha kolay

yapabildikleri ileri sürülmüştür. Bazen birbirinden tamamen farklı bölgelerde aynı zaman da aynı β -laktamaz ortaya çıkarken, bazen de bir bakteride birden çok β -laktamaz saptanabilmektedir. Farklı ESBL tipleri farklı direnç şekilleri oluşturabilmektedir (54).

Tüm TEM ve SHV derivesi ESBL'ler, genel aktivite paternini yansıtan antibiyogram larla değerlendirilebilirler fakat rezistans seviyelerinde enzimler değişkendir ve farklı bileşiklere neden olurlar (55). Bazıları tüm yeni kuşak sefalosporinlere direnç oluştururken (TEM-3,4, SHV-4,5), bazıları (TEM-10 ve 26) seftazidim için daha yüksek V_{max} değerine sahip olup “seftazidimaz fenotipi” göstermektedir. Bunların evrimsel ataları olan TEM-12 halen zayıftır ve genellikle seftazidim MİK'ini *Klebsiella* ve *E.coli* için sadece 4-8 μ g/ml arttırır ve özellikle seftazidime porin defektli bir suşta büyük rezistans olmasına rağmen sefotaksim ve seftriakson MİK'lerini 0.06-0.25 μ g/ml civarında tutar. Bu ciddi sorunlar oluşturur. Hayvan deneyleri ve klinik veriler ESBL üreticilerinin, bu bileşiklerin MİK'leri 1-2 μ g/ml'ye ulaştığında bile aminotiazolil sefalosporinlere dirençli olduklarını göstermektedir (47, 52, 56, 57).

ESBL enzimlerine karşı kullanılan inhibitör kombinasyonları her zaman etkili olmayabilir. Enzim çok miktarda sentezleniyorsa, birden fazla enzim varsa veya porin kaybına bağlı permeabilite azalmışsa direnç gözlenebilir. Sulbaktamın SHV türevi enzimlere karşı aktivitesinin olmadığı bilinmektedir. Sefamisinlerden sefotetan, sefoksitine tercih edilmelidir. Çünkü sefotetanın anti-*Klebsiella* aktivitesi daha yüksektir ve sefoksitinin porin eksikliği olan *Klebsiella* mutantlarını seleksiyona uğrattığı bilinmektedir (54).

2. 3. 4. 2. ESBL Tipleri:

Klasik olarak tanımlanan ESBL'lerin büyük çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almıştır. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan ESBL'lerde de büyük bir artış olmuştur. Yapısal özellikleri ve evolüsyon açısından ESBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılır. Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES/IBC, TLA, BES ve OXA'dır. ESBL tipleri ve bunların aminoasit değişiklikleri “<http://www.lahey.org/studies/webt.html>” adresinde verilmektedir. Şimdiye kadar tanımlanan ESBL'lerin sayısı 200'ü aşmıştır (42, 53).

1. TEM Kökenli ESBL'ler:

Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1 bakteride ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin direncine neden olur. *E.coli*'deki ampisilin direncinin %90'ından sorumludur. TEM-2'nin substrat yapısı TEM-1 ile aynıdır, biyokimyasal yapısı benzerdir ve bunlar dar spektrumlu enzimlerdir. Ancak 12 farklı pozisyonda oluşan aminoasit değişiklikleri 100'ün üzerinde TEM kökenli ESBL'nin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. TEM-1'in tranpozonda kodlanması sonucu bu enzim *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae* izolatlarına geçmiştir. ESBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür ve 1987'de bildirilmiştir (36, 47, 53).

Bu enzimlerin bir kısmı 'inhibitör dirençli TEM (IRT) türünde enzimler olup, TEM-50, TEM-68 hariç geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmediklerinden ötürü gerçek anlamda ESBL olarak kabul edilmezler buna karşın, TEM ve SHV türü enzimlerden köken aldıkları için ESBL'ler ile birlikte ele alınırlar (36). Bu son sayılan enzimler adlarından da anlaşılacağı üzere, klasik ESBL'lerin aksine β -laktamaz inhibitörlerinin etkilerine (özellikle sulbaktam ve klavulanat) karşı dirençlidirler. Ancak, tazobaktam bu enzimleri inhibe etmektedir. Günümüzde 20'den fazla IRT tanımlanmış durumdadır. TEM kökenli ESBL'ler en sık *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de tanımlanmış olmakla birlikte, enterik ve non-enterik pek çok bakteride de bulunabilecekleri bildirilmiştir. Bu bakteriler arasında *Enterobacter*, *Proteus* ve *Salmonella* türleri, *P.aeruginosa* ve *Capnocytophaga ochracea* sayılabilir. IRT'ler de benzer şekilde en sık *E.coli*'de, daha seyrek olarak *Klebsiella*, *Proteus* ve *Citrobacter* türlerinde tanımlanmıştır (36, 58). Tek bir β -laktamaz içindeki ESBL ve inhibitöre dirençli özgül mutasyonların kombinasyonu ise "kompleks mutant enzim" olarak adlandırılır (TEM-50/CMT-1 ve SHV-10) (46, 59).

2. SHV Kökenli ESBL'ler:

SHV-1 en sık *K.pneumoniae*'de bulunur ve bu bakterideki plazmid aracılığıyla gelişen ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. SHV kökenli ESBL'lerin sayısı TEM kökenli olanlara kıyasla daha az olup, günümüzde sayıları yaklaşık 50 civarındadır. Bu enzimlerden sadece bir tanesi (SHV-10) 'inhibitör dirençli' özellik göstermektedir. SHV kökenli ESBL'ler *K.pneumoniae* dışında *Citrobacter diversus*, *E.coli* ve *P.aeruginosa*'da da tanımlanmıştır. ESBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda

karakteristik değişiklik, 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir. Bunun dışında 179, 205 ve 240. pozisyonlardaki değişimler ESBL fenotipi için önemlidir (36).

3. CTX-M Tipi ESBL'ler:

Bu enzimler özellikle sefotaksimi substrat olarak tercih eden özelliğe sahiptirler. Başlıca *Salmonella typhimurium* ve *E.coli*'de tanımlanmış olmakla birlikte diğer bazı enterik gram-negatif bakterilerde de gösterilmişlerdir. Otuzdan fazla değişik tipi bulunan bu enzimler, TEM ve SHV kökenli enzimlerle en fazla %40 civarında benzerlik göstermektedirler ve farklı olarak toplum kökenli infeksiyonlardaki izolatlarda sık izole edilirler. Bu grup enzimin en önemli özelliği sefotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmesidir. Benzer şekilde 1. kuşak sefalosporinlere benzilpenisiline kıyasla daha yüksek afinite gösterirler. Bu enzimi taşıyan mikroorganizmalar seftazidime klinik açıdan anlamlı direnç göstermezler. CTX-M türü enzimler yakın zamanda ülkemizde de gösterilmiştir (36, 53). Bu enzimlerin önemli bir özelliği de; bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır. Günümüzde CTX-M ailesinde 40 enzim bulunmaktadır ve CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olarak tanımlanan 5 gruba ayrılmıştır (36, 45, 60).

4. OXA Tipi Enzimler:

Bu enzimler diğer ESBL'lerin aksine Ambler sınıflamasında D moleküler grubunda ve fonksiyonel grup 2d'de yer alırlar (36, 45, 47). Oksasiline yüksek afinite göstermeleri nedeniyle bu adı almışlardır. β -laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf bir biçimde inhibe edilirler. Bu enzimler esas olarak *P.aeruginosa*'da tanımlanmıştır. Enzimlerin çoğu OXA-2 ve OXA-10 kökenlidir (47, 61). OXA-1'den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir. Bu tipteki enzimlerin birçoğu ülkemizden elde edilen *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır ve geniş spektrumlu olan ilki OXA-11 Hacettepe Üniversitesi Hastanesinden bildirilmiştir (53, 60, 61). Bu enzimleri taşıyan *Pseudomonas*'ların en önemli özelliği seftazidime yüksek direnç göstermeleridir (47). Bu durumun tek istisnası OXA-17 olup, sefotaksim ve seftriaksona direnç sağlar. OXA türü enzimler *P.aeruginosa* dışında *A.baumannii* izolatlarında da tanımlanmıştır. Bu enzimlerden bazıları ESBL özelliği taşımamaktadır (36, 53). OXA enzimleri içinde OXA-23, OXA-24 gibi yeni

tanımlanan bazı enzimler ise karbapenemaz aktivitesi göstermektedir; bunlar ESBL değildir (36, 62).

5. PER Tipi Enzimler:

Bu enzimlerden PER-1 ülkemizde önce *S.typhimurium*, takiben *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *P.aeruginosa* izolatlarının %10'u, *A.baumannii* izolatlarının %40'ı bu enzimi taşıyarak seftazidime direnç göstermektedir. Bu bakterilerle nozokomiyal infeksiyon geliştiren hastalarda, bakterinin PER-1 enzimini taşıyor olması mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde belirleyici olarak saptanmıştır. PER-1 ülkemiz dışında Fransa (Türkiye'den giden bir hastadan elde edilen bir izolatta) ve İtalya'da *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmış ve yakın zamanda Güney Kore'den bildirilen bir raporda *Acinetobacter* izolatlarının % 56'sında bulunduğu gösterilmiştir (36, 63).

Bu grubun diğer üyesi PER-2 Arjantin'de *S.typhimurium* izolatlarında tanımlanmıştır. PER grubu enzimler özellikle seftazidim olmak üzere aminotiazolil sefalosporinlere direnç sağlarlar. Penisilinler bu enzimler için zayıf birer substrat olup, piperasilin in-vitro olarak PER enzimlerine karşı aktivitesini korur. β -laktamaz inhibitörleri, sefamisinler ve karbapenemler de bu enzimlere karşı aktivite gösterirler (36, 53).

6. Diğer ESBL'ler:

Bu enzimler içinde yapısal olarak PER-1 ile ilişkili olan VEB-1 Güneydoğu Asya'da tanımlanmıştır. İlk olarak Vietnam'da bir *E.coli* suşunda gösterilmiş daha sonrada Tayland'da *P.aeruginosa*'da bulunmuştur. İsimleri yukarıda sayılan diğer enzimler dünyanın farklı ülkelerinde tek tek bakteri suşlarında tanımlanmıştır. Bunlar içinde PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1 ve TLA-1 birbirleriyle ilişkili olup, yaklaşık %40-50 civarında homoloji gösterirler. Hepsi oksiminio sefalosporinlere, özellikle de seftazidime ve aztreonama karşı direnç gelişimini sağlarlar. Bu enzimlerin bir kısmı *Bacteroides* türlerinin kromozomal β -laktamazi ile kısmi bir homoloji gösterdikleri ve bu türden köken almış olabilecekleri düşünülmektedir (36, 45, 53).

2. 3. 4. 3. ESBL'lerin Klinik Önemi:

ESBL pozitif bakteriler başlıca sepsis, üriner sistem infeksiyonu ve solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. ESBL'nin laboratuvarlarca gerektiği ölçüde rapor edilememesi nedeniyle klinisyenler ESBL'nin öneminin farkında değildir. ESBL'nin aynı veya farklı cins bakterilere taşınabilmesi özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olabilir. ESBL pozitif suşlarla gelişen infeksiyonlarda komplikasyon riski ve mortalite oranı yüksektir. ESBL pozitif suşlar üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere in vitro duyarlı olsa bile tedavide başarısızlık görülebilir. Paterson ve ark.(64) ESBL pozitif *K.pneumoniae*'ye bağlı 32 bakteremik olguda sefalosporin etkinliğini araştırmıştır. Sefalosporinlere orta düzeyde duyarlı bakterilerle gelişen dört olguda sefalosporin tedavisi başarısız olurken, in vitro olarak sefalosporinlere duyarlı görünen suşlarla infekte olguların 15/28 (%58)'inde tedavi başarısızlığı, 11 olguda tedavi değişikliği ve dört olguda ölüm gözlenmiştir (64).

ESBL sentezleyen *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşları bir çok antibiyotiğe dirençli olduklarından bunlarla gelişen infeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Bu tip infeksiyonlarda antibiyotiklerin etkinliğini araştıran kontrollü, randomize araştırmalar yoktur ve yapılması da güçtür (53, 65, 66).

Yakın zamanda yayınlanan çok merkezli prospektif bir çalışmada, ESBL sentezleyen *K.pneumoniae* ile gelişen bakteremilerde antibiyotik seçiminin çok önemli olduğu ve baktereminin başlangıcından itibaren ilk beş gün içinde uygulanan karbapenemin in vitro olarak aktif görünen diğer antibiyotiklere kıyasla mortaliteyi önemli oranda azalttığı bulunmuştur (65). Diğer retrospektif bir araştırmada ise ESBL üreten *K.pneumoniae* ve *E.coli* bakteremilerinde sefalosporin kullanıldığında tedavi başarısının düşük olduğu ve en etkili antibiyotiklerin siprofloksasin ve karbapenemler olduğu gözlenmiştir. Buna karşın ampririk tedaviye uygun antibiyotik ile başlanmasa bile duyarlılık test sonuçlarına göre uygun antibiyotiğe geçildiğinde mortalitede bir fark olmadığı gözlenmiştir (67).

2. 3. 4. 4. ESBL Üreten Bakterilerle Gelişen İnfeksiyonlarda Risk Faktörleri:

Çeşitli kontrollü çalışmalar, ESBL üretimine ilişkin birbirinden bağımsız bazı risk faktörlerinin olduğunu göstermiştir. En sık belirlenmiş olan risk faktörleri, uzun süreli hastanede kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma veya daha önceden de hastanede kalma ve

çok antibiyotik (özellikle uzun süreli geniş spektrumlu sefalosporin) kullanımındadır. Bir çok çalışmada daha önceden üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada üçüncü kuşak sefalosporin ve/veya aminoglikozid kullanımının ESBL üreten suşla kolonizasyon ve infeksiyon için yaklaşık 18 kat risk taşıdığı gösterilmiştir. Transplantasyon hastaları, onkoloji hastaları, yanıklı olgular ve yenidoğanlar ESBL için risk altındadır. Sık tanımlanan diğer risk faktörleri entübasyon ve mekanik ventilasyon, santral venöz, arteriyel veya üriner katater bulunması, acil intraabdominal cerrahi ya da ve kalp yetmezliğidir (29, 36, 51, 68).

2. 3. 4. 5. ESBL'lerin Laboratuvar Tanı Yöntemleri:

Enterobacteriaceae'lerde ESBL üretme prevalansında artış, klinik izolatlarda bu enzimlerin varlığını kesin olarak tayin edecek laboratuvar yöntemlerine büyük ihtiyaç duyulmasına yol açmıştır. Bununla birlikte hem MİK saptanması, hem de disk difüzyon yöntemlerinin *K.pneumoniae* ve *E.coli*'nin tüm suşlarındaki ESBL'yi saptamada başarısız oldukları ortaya konmuştur (45). ESBL ürettiği halde MİK yükselmekle birlikte CLSI standartlarına göre "dirençli" sınıra ulaşmayabilir ve ESBL araştırılmamış ise bu izolatlar geniş spektrumlu β -laktamlara duyarlı olarak bildirilir ve sonuçta özellikle bakteremi olgularında fatal sonuçlanır (36, 52). Bunun nedenlerinden biri inokulum etkisine bağlı olabilir. ESBL üreten bazı bakteriler rutin duyarlılık testlerinde kullanılan 10^5 cfu/ml bakteri yoğunluğunda duyarlı görünmelerine karşın, inokulum 10^7 veya 10^8 cfu/ml'ye çıktığında, ki bir çok infeksiyonda bakteri yoğunluğu bu düzeye çıkabilmektedir, dirençli görünebilir (52).

ESBL'lerin rutin laboratuvarlarda tanımlanmalarının gerekliliği tartışmalı olsa da yukarıdaki nedenlere bakıldığında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak ESBL saptama yöntemleri uygulanmalı ve sonuçlar buna göre yorumlanmalıdır. ESBL saptama yöntemleri, tarama ve doğrulama testleri olarak iki kısımda incelenebilir. Disk difüzyon ve dilüsyon tarama testlerinde CLSI'nın önerdiği gibi farklı geniş spektrumlu β -laktamlar kullanılarak testin duyarlılığı belirgin ölçüde arttırılır. Tablo 4'de CLSI tarafından tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK sınırları gösterilmiştir.

Fenotipik doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin ve/veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler ESBL'leri β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen AmpC tipi enzimlerden ayırmaktadır. Doğrulama amacıyla sık olarak kullanılan yöntemler arasında; klavulanik

asit içeren kombinasyon diskleri, çift disk sinerji testi, MİK'in saptandığı dilüsyon yöntemleri, E-testin ESBL stripleri ile MİK saptanması sayılabilir.

Tablo 4. ESBL'ler İçin Tarama Testi Olarak Önerilen İnhibisyon Zon Çapı ve MİK Değeri Sınırları (69).

Antibiyotikler	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µg/mL)*
Sefotaksim (CTX)	≤ 27	≥ 2
Seftriakson (CRO)	≤ 25	≥ 2
Seftazidim (CAZ)	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksim (POD)	≤ 17	≥ 8
Aztreonam (ATM)	≤ 27	≥ 2

* CLSI'e göre, indikatör β-laktam 1µg/ml, konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan mikrodilüsyon plakları tarama amacıyla kullanılır.

1. Kombinasyon Disklerinin Kullanımı : Bu amaçla sefotaksim (30µg) ve seftazidim (30µg) disklerine 10µg klavulanik asit eklenir. Standart yoğunlukta bakteri yayılan Mueller-Hinton agar (MHA) plaklarına klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. İnhibisyon zonları ölçüldüğünde klavulanik asit içeren, içermeyenlere göre ≥5mm daha genişse izolat ESBL pozitifdir (53, 69).

2. Çift Disk Sinerji Testi : Plağın ortasına amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC; 20/10µg) ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 25 mm olacak şekilde CAZ, CRO, CTX, ATM veya POD diskleri yerleştirilir. İnkübasyondan sonra sefalosporin veya ATM etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması ESBL varlığını gösterir.

Kolay, rutin ve ucuz olması avantajlarıdır. Dezavantajı ise, izolatın ürettiği enzim miktarına veya tipine göre diskler arası uzaklığın standardizasyonunun olmamasıdır ve yorumu subjektiftir. SHV-2 taşıyan izolatlarda yanlış negatif sonuç vermektedir. *S.maltophilia*'da da yanlış pozitiflik görülmektedir.

3. Sulandırım Yöntemleri: β-laktamaz inhibitörleri varlığında sefalosporin direnç düzeylerindeki azalmanın gösterilmesi için standart mikrodilüsyon yöntemi de

kullanılabilir. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 8 kat azalma ESBL pozitifliğini gösterir.

4. E-Test ESBL Stripleri: Yine klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde azalmayı gösterir. Striplerin bir ucunda seftazidim veya sefotaksim, diğer ucunda klavulanik asitle kombinasyon şekli hazırlanır. Kombine kısmında MİK değerlerinde 8 kat azalma ESBL pozitifliğini gösterir. Bazen MİK değerlerinin okunmasına engel olabilen “fantom zon” ESBL göstergesi olarak kabul edilir. Enzimatik aktivitesi düşük olan ESBL’leri saptamada güçlük bulunması ve maliyetinin yüksek olması rutin kullanımını kısıtlamaktadır (69).

5. Diğer Fenotipik Yöntemler: Klavulanik asit, konsantrasyonu 4µg/ml olacak şekilde MHA içine katılabilir. Klavulanik asit içeren ve içermeyen MHA’ların zon çapları ölçülerek klavulanik asit varlığındaki genişleme değerlendirilir. Bir diğer yöntem de Thomson ve Sanders’in bildirdiği üç boyutlu testtir. Ancak teknik olarak güçtür. Bunların dışında otomatize sistemlerin ESBL saptama programlarında bulunmaktadır. Örnek olarak Vitek-2 (bioMerieux), Walk Away (Dade Behring) ve Phoenix (Becton Dickinson) verilebilir. Yapılan bir çalışmada Phoenix ESBL üreten tüm suşları saptarken, Vitek-2, %81 oranında saptamıştır. Ancak otomatize sistemlerle ESBL saptanmasında sorun olabileceği unutulmamalıdır. Bu fenotipik yöntemlerin hiçbirinin duyarlılık ve özgüllüğü %100 değildir. Moleküler yöntemler rutin için uygun değildir. Enzimin kesin olarak tanımlanması sadece dizi analizi ile mümkün olmaktadır. ESBL saptanmasında çeşitli yöntemler, avantaj ve dezavantajları Tablo 5’te verilmiştir (36, 45, 69).

Tablo 5. ESBL'lerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler (36, 45, 69).

Test	Olumlu özellikleri	Olumsuz özellikleri
Standart CLSI kriterleri	Kullanımı kolay, her laboratuvarında uygulanabilir	ESBL'leri her zaman doğru saptamayabilir
ESBL doğrulama testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılık seçilen oksimino sefalosporine göre değişir
Çift disk sinerji testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Uygulanan diskler arasındaki mesafe standart değil
Üç boyutlu test	Duyarlı yorumu kolay	ESBL için özgül değil, emek yoğun
E-Test ESBL şeritleri	Kullanımı kolay	Yorumu her zaman kolay değil, ÇDST kadar duyarlı değil
Vitek ESBL testi	Kullanımı ve yorumu kolay	Duyarlılık düşük
DNA problemleri	Gen ailesi için özgül (Ör.;TEM veya SHV)	Emek yoğun, genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz. TEM veya SHV türevlerini ayırt etmez
PCR	Kolay uygulanır, gen ailesi için özgüldür (Ör.;TEM veya SHV)	Genişlemiş spektrumlu olanları olmayandan ayıramaz. TEM veya SHV türevlerini ayırmaz
Oligotiplendirme	Özgül TEM türlerini saptar	Özgül oligonükleotid problemleri gerektirir emek yoğunudur, yeni türevleri saptayamaz
PCR-RFLP	Kolay uygulanır, nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir	Saptanabilmesi için nükleotid değişikliklerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gerekir
PCR-SSCP	Çeşitli SHV türevlerini ayırdeder	Özel elektroforez koşulları gerektirir
LCR	Çeşitli SHV türevlerini ayırdeder	Çok sayıda oligonükleotid primeri gerekir
Nükleotid dizi analizi	Altın standarttır tüm türevleri saptayabilir	Emek yoğun, teknik zor olabilir, manuel yöntemleri yorumlamak güç olabilir

3. MATERYAL VE METOD

Nisan 2005-Ekim 2006 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bakterioloji Bölümüne çeşitli kliniklerden gelen yatan hastaların kan kültür örnekleri incelendi.

3. 1. Örneklerin İşleme Alınması:

Bakteriyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerde yatan hastalardan, otomatize kan kültürü şişeleri ile (aerobik BacT/ALERT FA bottle, bioMerieux, France) gelen ve BacT/ALERT 3D (bioMerieux, France) kan kültürü inkübatörüne yerleştirilip inkübatörde 5 gün tutulan örnekler takip edildi. Üreme sinyali veren otomatize kan kültürü şişelerinden steril koşullarda kanlı agar (Oxoid) ve EMB agara (Oxoid) pasajı yapılan, 37°C'de 18-24 saat inkübe edilen plaklarda üreyen mikroorganizmalar önce koloni morfolojilerine göre değerlendirildi. Pasaj yapılan besiyerinde mukoid görünümde, gram-negatif özelliğe uyan koloniler seçilerek incelenmeye alındı. Poliklinik hastası olanlar çalışmadan çıkarıldı. Bir hastadan ikinci kez aynı bakteri ürese bile sadece biri çalışmaya alındı.

3. 2. Suşların İdentifikasyonu:

EMB besiyerine Pasaja alınan ve üreyen bakteri kolonilerinin Gram boyanma özelliklerinin incelenmesi sonucunda gram-negatif olanların, katalaz ve oksidaz özelliğine bakıldı. Bunlara ek olarak; hareket özelliği, TSİ besiyerinde laktoza etkisi, sitrat ütilizasyonu, indol varlığı, üreaz aktivitesi gibi klasik biyokimyasal yöntemler uygulandıktan sonra *Klebsiella* genusuna dahil edilen suşlar çalışmaya alındı. Bu suşların tür düzeyinde araştırılması ise API 32 E (bioMerieux) kitleri ile Mini API cihazında yapıldı. API 32 E ile *K.pneumoniae* olduğu saptanan suşlar rutin disk difüzyon antibiyogram testinden ve kombine (modifiye) disk difüzyon ile ESBL testi yapıldıktan sonra, sonuçları kaydedilerek diğer testlerin çalışılmasına kadar saklamak amacı ile, cryobank (Mast diagnostics) boncukları içinde -20°C'de stoklandı.

3. 3. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında ESBL'nin Saptanması :

3. 3. 1. ESBL Üretiminin Doğrulama Testleriyle Araştırılması:

Saklamada tutulan (-20°C) *K.pneumoniae* suşlarımız canlandırılmak amacı ile EMB (oxid) besiyerine pasaja alındı. 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Çift Disk Sinerji (ÇDST), Kombine (Modifiye) Disk ve CT/CTL E-Test ESBL yöntemleriyle ESBL incelenmesi için Mueller Hinton Agar (MHA) kullanıldı. Tüm testlerde kontrol için ATCC 25922 *E.coli* ve ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşu kullanıldı.

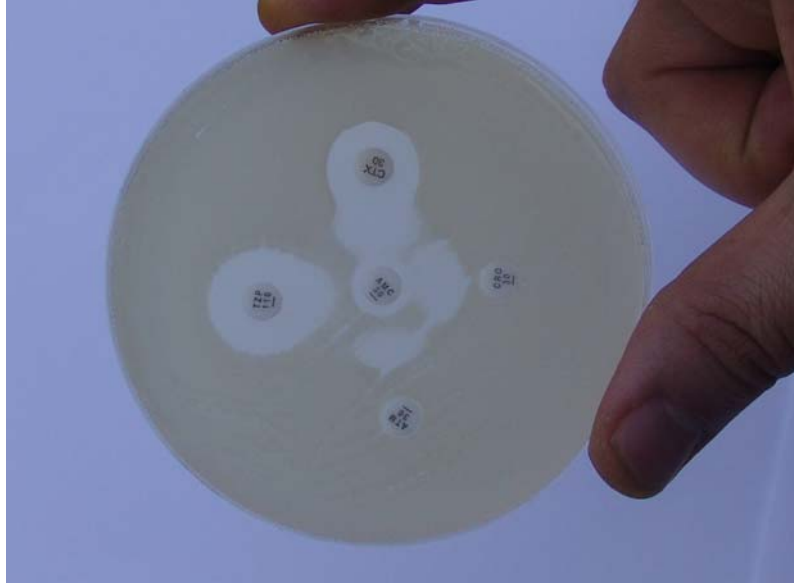
3. 3. 1. 1. ESBL Varlığının Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile Araştırılması:

K.pneumoniae suşlarında ESBL tespitinde ilk kullanacağımız yöntem ÇDST'dir. Bunun için suşlar CLSI önerileri doğrultusunda %5 kanlı agara pasaja alındı. Üreyen bakteri kolonileri Mc Farland 0,5 bulanıklığına uygun olarak buyyon içinde süspansiyonu yapıldı. Daha sonra bu süspansiyondan pamuklu silgiçlerle alınan suşlar ÇDST ve ESBL araştırmak için içerisinde MHA bulunan plak yüzeyine sürüntü ekimi yapıldı. MHA plağının tam ortasına amoksisilin/klavulanik asit diski (AMC; 20/10µg) ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 25mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson(CRO), sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM), imipenem (İPM) diskleri yerleştirildi. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, sefalosporinler veya ATM etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskinde doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması, ESBL varlığını gösterir şekilde, aksi durum ESBL negatif olarak değerlendirildi (Resim 1-2). İnhibisyon zonu oluşmadığında veya küçük zon oluştuğunda disk arası uzaklık 20 mm'ye düşürüldü, çok geniş zon çapları oluştuğunda ise disk arası uzaklık 40 mm'ye çıkarıldı.

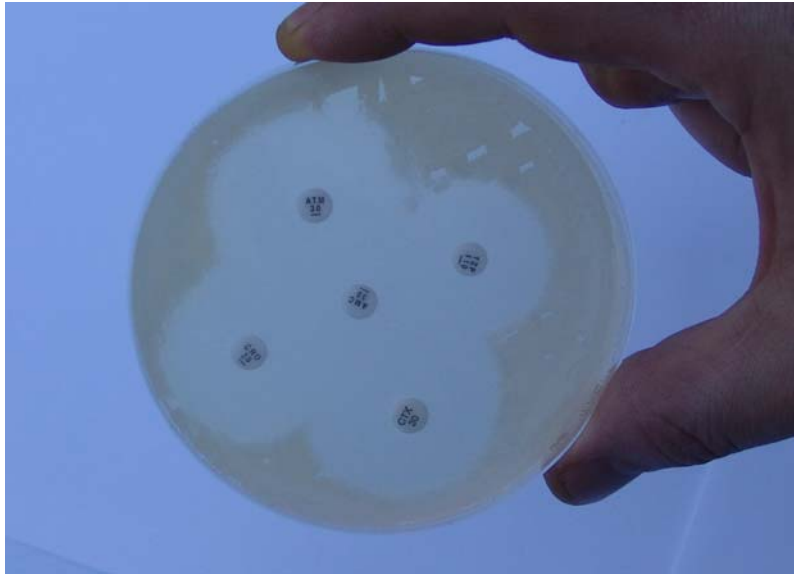
3. 3. 1. 2. ESBL Varlığının Kombine Disk (modifiye disk) Sinerji ile Araştırılması:

ESBL tespitinde kullanacağımız diğer bir yöntemde CLSI'nin fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine disk (modifiye) sinerji yöntemidir. Bunun için suşlar %5 kanlı agara pasaja alındı. Üreyen bakteri kolonilerinden buyyon içinde Mc Farland 0,5 bulanıklık standardına göre süspansiyonu hazırlanarak, MHA bulunan plaklara pamuklu

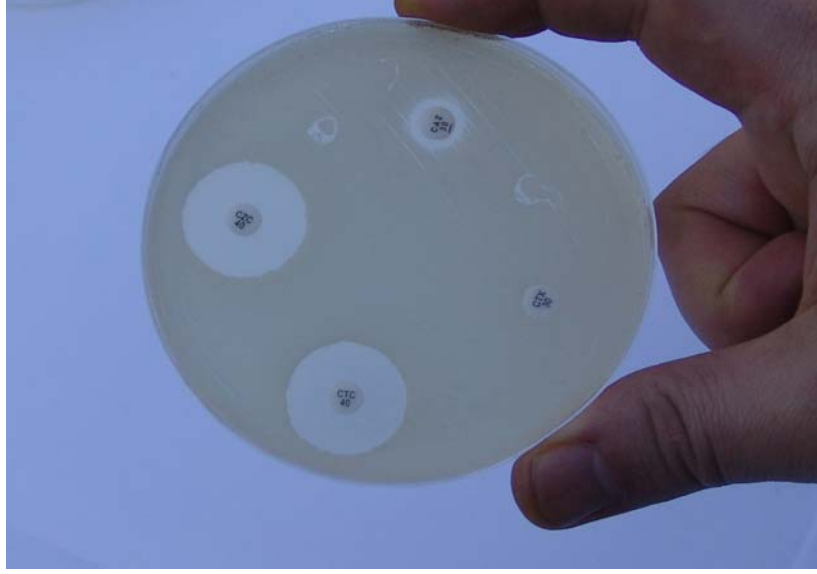
silgiçlerle sürüntü ekim yapıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilen bu plaklara seftazidim (30µl), sefotaksim (30µl), seftazidim/klavulanik asit (30/10µl) ve sefotaksim/klavulanik asit (30µl/10) diskleri yerleştirildi. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, sefotaksim ve seftazidim diskinin inhibisyon zon çapının, CLSI önerileri doğrultusunda klavulanik asit ile test edildiğinde tek başına test edilmesine göre $\geq 5\text{mm}$ artması ESBL pozitif, diğer durum ise ESBL negatif kabul edildi (Resim 3-4).



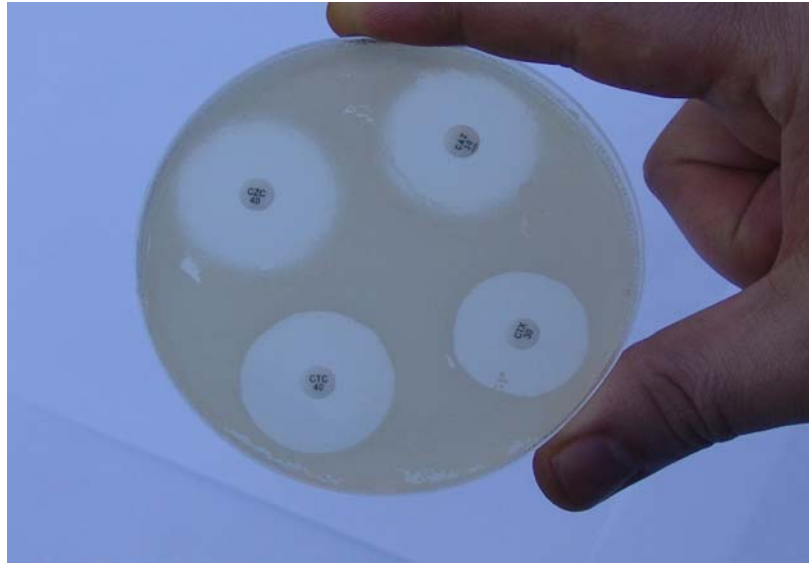
Resim 1: Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) yöntemi ile ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşu (Çalışmamızdan).



Resim 2: Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) yöntemi ile ESBL negatif *K.pneumoniae* suşu (Çalışmamızdan).



Resim 3: Kombine Disk (modifiye disk) Sinerji yöntemi ile ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşu (Çalışmamızdan)



Resim 4: Kombine Disk (modifiye disk) Sinerji yöntemi ile ESBL negatif *K.pneumoniae* suşu (Çalışmamızdan)

3. 3. 1. 3. ESBL Varlığının E-Test Yöntemi ile Araştırılması:

ESBL varlığının gösterilmesinde uyguladığımız en son yöntem CT/CTL E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemidir. Bunun için CLSI önerileri doğrultusunda %5 kanlı agara pasajı yapılarak, üretilen bakteri kolonilerinden buyyon içinde Mc Farland 0,5

bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlandı. Buradan ESBL araştırmak için içerisinde MHA bulunan plaklara pamuklu silgiler ile sürüntü ekim yapıldı. Oda derecesinde 15 dakika beklettikten sonra ekim yapılan plaklara sefotaksim/sefotaksim klavulanik asit E-test şeridi ile diğer antibiyotiklerin E-test şeridi yerleştirildi. 35°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra, CLSI nerileri doğrultusunda sefotaksim/klavulanik asit MİK değerinde, sefotaksim MİK değerine göre 8 kat ve üzerinde azalma olduğunda ve sefotaksim inhibisyon elipsindeki deformasyonlar ESBL pozitif, aksi ise ESBL negatif kabul edildi (Resim 5-6).



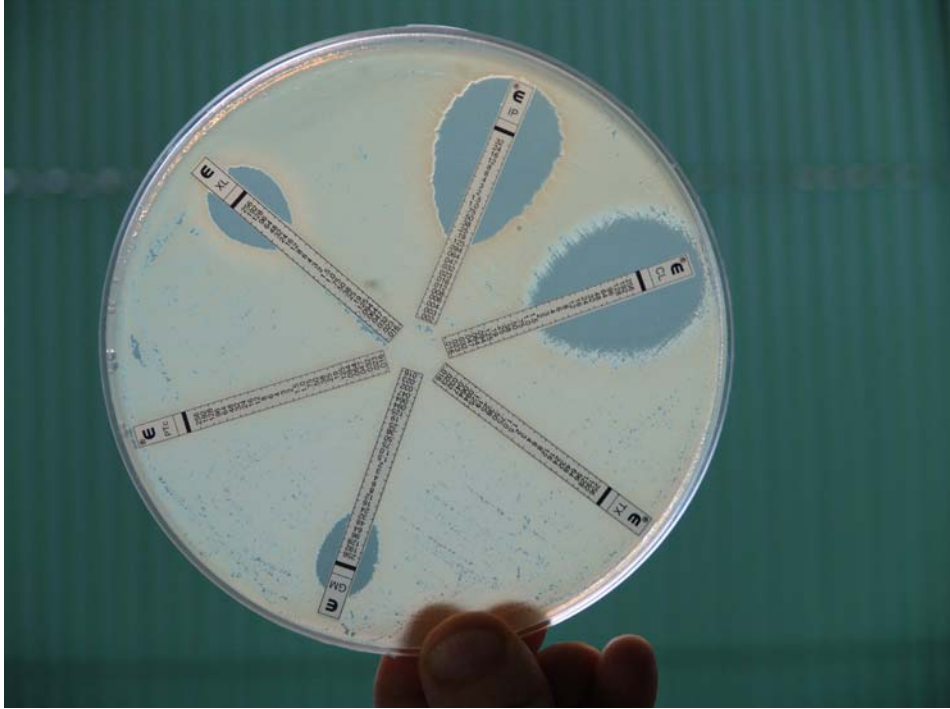
Resim 5: E Test yöntemi ile ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşu (A: Fantom Zonu) (alışmamızdan).



Resim 6: E Test yöntemi ile ESBL negatif *K.pneumoniae* suşu (alışmamızdan).

3. 4. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç:

K.pneumoniae suşlarının antimikrobiyallere direnci, MİK tespitine yönelik E-test yöntemi ile incelendi. ESBL pozitif ve negatif tüm suşlarda antimikrobiyal direnç araştırılarak, her iki durumdaki direnç oranları tespit edildi. Bunun için suşlar CLSI önerileri doğrultusunda %5 kanlı agara pasaja alındı. Üreyen bakterilerin buyyon içinde Mc Farland 0,5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu hazırlandı. Buradan pamuklu silgiçlerle alınan örnekler Mueller Hinton Agar plaklarına sürülerek amikasin, gentamisin, imipenem, siprofloksasin, amoksisilin/klavulanat, seftazidim, seftriakson, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam, kloramfenikol E-test stripleri yerleştirildi, 35°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra inhibisyon elipsine denk gelen MİK değerleri belirlendi (Resim 7). Buna göre az duyarlı suşlar dirençli olarak kabul edildi. Daha sonra ESBL üreten ve üretmeyen tüm suşların direnç oranları incelenerek karşılaştırıldı.



Resim 7: E test yöntemi ile *Klebsiella pneumoniae* suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı MİK düzeyleri (Çalışmamızdan).

3. 5. İstatistiksel Analiz

Kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının ESBL üretiminin kliniklere göre dağılımları incelenip, ESBL üretimi yönünden anlamlı derecede yüksek oran gözlenen klinikler tespit edildi. Daha sonra *K.pneumoniae* suşlarının genel ESBL üretim oranları belirlendi. Çift disk sinerji testi ve CT/CTL E-testin ESBL saptama oranlarının CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine (modifiye) disk sinerji yöntemine göre spesifitesi ve sensitivitesi çıkarılarak SPSS versiyon 13.0 programında bu testlerin üçününde tutarlılık analizi yapıldı. Antimikrobiyal direnç oranları E-test MİK saptama yöntemi kullanılarak belirlendi. ESBL üreten, üretmeyen izolatların antimikrobiyal direnç oranları SPSS versiyon 13.0 programında chi-square testi kullanılarak karşılaştırıldı ve $p < 0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ESBL üreten, üretmeyen ve tüm suşlar için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri amikasin, gentamisin, imipenem, siprofloksasin, amoksisilin/klavulanat, seftazidim, seftriakson, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam, kloramfenikol E-testleri kullanılarak belirlenip, istatistiksel analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada yatarak tedavi gören hastaların kan kültür örneklerinden izole edilen toplam 102 *K.pneumoniae* suşundan 23'ü (%22.6) Reanimasyon Ünitesi, 21'i (%20.6) Pediatri kliniğinde yatan hastalardan gelen örneklerden izole edilmiştir. Diğerleri sırasıyla Dahiliye 11 (%10.8), Nöroloji 10 (%9.8), Üroloji 10 (%9.8) ve Göğüs Hastalıkları kliniğinde yatan hastalardan 7 (%6.9) *K.pneumoniae* suşu izole edilmiştir. Çalışmaya aldığımız *K.pneumoniae* suşlarının kliniklere göre dağılımları Tablo 6'da gösterilmiştir.

ESBL pozitifliği incelendiğinde Göğüs Hastalıkları kliniğinden gelen kan kültürlerinde tespit edilen 7 *K.pneumoniae* izolatının 7'sinde (%100) başta olmak üzere, Üroloji'den gelen örneklerdeki 10 izolatın 9'unda (%90), Reanimasyon'dan gelen 23 izolatın 18'inde (%78.3) ve Nöroşirürji'den gelen 4 izolatın 3'ünde (%75) ESBL varlığı gözlenmiştir. ESBL pozitiflik oranlarının kliniklere göre dağılımı Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının ve ESBL Pozitiflik Oranlarının Kliniklere Göre Dağılımı

Servis	Sayı	(%)	ESBL(Pozitif)	(%)
Reanimasyon	23	(22.6)	18	(78.3)
Pediatri	21	(20.6)	11	(52.4)
Dahiliye	11	(10.8)	4	(36.4)
Nöroloji	10	(9.8)	5	(50)
Üroloji	10	(9.8)	9	(90)
Göğüs Hastalıkları	7	(6.9)	7	(100)
Çocuk Cerrahisi	4	(3.9)	2	(50)
Acil Servis	4	(3.9)	2	(50)
Nöroşirürji	4	(3.9)	3	(75)
İnfeksiyon Hastalıkları	2	(1.95)	1	(50)
Kardiyoloji	2	(1.95)	1	(50)
Diğer Klinikler	4	(3.9)	2	(50)
TOPLAM	102	(100)	65	(63.73)

İzole edilen 102 *K.pneumoniae* suşunun CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine disk (modifiye) sinerji testi ile 65'inde (%63.7) ESBL varlığı belirlenmiştir. Bu suşların 63'ünde ÇDST ile ESBL varlığı, CT/CTL E-Test ile 61'inde ESBL varlığı saptanmıştır. Bu suşların 61'inde her üç yöntem ile ESBL pozitifliği bulunmuştur. ESBL pozitiflik oranının yöntemlere göre dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. ESBL Pozitiflik Oranının Yöntemlere Göre Dağılımı

YÖNTEM	ESBL Pozitiflik n=102	ESBL Negatiflik n=102
ÇDST	63 (%61.8)	39 (%38.2)
CT/CTL E-Test	61 (%59.8)	41 (%40.2)
Kombine Disk Sinerji	65 (%63.7)	37 (%36.3)
Her Üç Test ile	61 (%59.8)	37 (%36.3)

Çift disk sinerji testi ve CT/CTL E-test yöntemlerinin kombine disk yöntemine göre duyarlılık ve seçicilik oranları Tablo 8'de sunulmuştur. İki yöntemin de seçicilikleri kombine disk yöntemine göre %100, duyarlılıkları ise çift disk sinerji testinde %96.9 CT/CTL E-test yönteminde ise %93.9 olarak saptandı.

Tablo 8. ÇDST ve E-Test Yöntemlerinin, Kombine Disk Yöntemine Göre Duyarlılık ve Seçicilikleri

Yöntemler	Duyarlılık	Seçicilik	Pozitif prediktif değer	Negatif prediktif Değer
ÇDST	%96.9	%100	%100	%94.9
CT/CTL E-Test	%93.9	%100	%93.9	%90.2

Çift disk sinerji testi, ESBL E-test ve kombine (modifiye) disk difüzyon testlerinin tutarlılık analizlerinin sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir. Üç yöntemin de tutarlılık analizlerinde istatistiksel olarak birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Tablo 9. ESBL Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması (Tutarlılık Analizi)

Testler	Gözlenen Tutarlılık	Kappa Değeri	Anlamlılık (p)
1-2	0.98	.958	0.0001
2-3	0.98	.959	0.0001
1-3	0.96	.917	0.0002

1: Kombine disk difüzyon testi; 2: Çift disk sinerji testi; 3: CT/CTL ESBL E-test

ESBL pozitif ve negatif *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının E-Test yöntemiyle antibiyotiklere direnç oranları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının E-Test Yöntemiyle Antibiyotik Dirençlilik Oranları

ANTİBİYOTİKLER	<i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatları		
	ESBL Pozitif n=65 (%)	ESBL Negatif n=37 (%)	Tüm Suşlar n=102 (%)
Amikasin	18 (27.7)	1 (2.7)	19 (18.6)
Gentamisin	48 (73.9)	0 (0.0)	48 (47)
İmipenem*	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Siprofloksasin	36 (55.4)	1 (2.7)	37 (36.3)
Amoksisilin/Klavulanat	46 (70.8)	12 (32.4)	58 (56.9)
Seftazidim	61 (93.9)	0 (0.0)	61 (59.8)
Seftriakson	58 (89.2)	0 (0.0)	58 (56.9)
Trimetoprim/Sülfametoksazol	32 (49.2)	2 (5.4)	34 (33.3)
Piperasilin/Tazobaktam	39 (60.0)	5 (13.5)	44 (43.1)
Kloramfenikol	27 (41.5)	2 (5.4)	29 (28.4)

İmipenem*: İmipenem hariç, antibiyotiklere karşı, ESBL üreten ve üretmeyenler arasında dirençlilik oranları istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulundu.

Kan izolatu *K.pneumoniae* suşlarının antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında; tüm suşlar imipeneme duyarlı olarak belirlendi. İmipenem haricindeki antimikrobiyal ajanlara karşı, ESBL üreten izolatlar, üretmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$)

derecede daha yüksek oranda dirençli bulundu. Tüm suşlar içinde imipenemden sonra en çok duyarlılık amikasin (%81.4) ve kloramfenikolde (%71.6) gözlemlendi.

ESBL üreten suşlarla olan infeksiyonlarda sık kullanılan; piperasilin/tazobaktama karşı çalışmadaki ESBL pozitif suşlarda direnç oranı; %60 ve tüm suşlarda direnç oranı; %43.1 olarak, siprofloksasinde ise ESBL pozitif suşlarda %55.4 ve tüm suşlarda direnç oranı ise; %36.3 olarak belirlendi. Trimetoprim/sülfametoksazolde ESBL pozitif suşlarda direnç oranı; %49.2 ve tüm suşlarda direnç oranı; %33.3 olarak saptandı. ESBL pozitif suşlarda; en yüksek direnç seftazidim %93.9 ve seftriaksona %89.2 karşı saptanmıştır. Daha sonra gentamisin %73.9 amoksisilin/klavulanata %70.8, piperasilin/tazobaktama %60, siprofloksasine %55.4, trimetoprim/sülfametoksazola %49.2 oranında direnç bulundu. Tüm suşlarda ise; en yüksek direnç seftazidime %59.8, seftriaksona %56.9, amoksisilin/klavulanata %56.9, sonrada gentamisin %47 ve piperasilin/tazobaktama %43.1 karşı saptandı. ESBL negatif olan 37 suşta ise; imipenem, gentamisin, seftriaksona ve seftazidime direnç görülmemiştir. Bu 37 suşta en yüksek direnç amoksisilin/klavulanata karşı saptanırken (%32.4), amikasine %2.7, trimetoprim/sülfametoksazole ve kloramfenikole %5.4 oranında direnç gözlemlendi.

Kan izolatı 102 *K.pneumoniae* suşunun ESBL üreten, üretmeyen ve tüm suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları Tablo 11’de gösterilmiştir.

ESBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarının MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, ESBL üretmeyenlere oranla yüksek olarak saptanmıştır. ESBL üreten izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, ESBL üretmeyenlerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinden belirgin olarak yüksek bulundu. ESBL üreten ve üretmeyen suşlarda sadece amoksisilin/klavulanatın MİK₉₀ değerleri birbirine yakın olarak bulundu.

Tablo 11. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının E-Test Yöntemiyle $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ Değerleri

ANTİBİYOTİKLER ($MİK$ aralıkları)	ESBL Pozitif n=65		ESBL Negatif n=37		Tüm Suşlar n=102	
	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$
Amikasin (0.016-256 µg/ml)	12	48	1.5	2	3	24
Gentamisin (0.016-256 µg/ml)	64	>256	0.5	0.75	1	>256
İmipenem (0.002-32 µg/ml)	0.19	0.94	0.19	0.25	0.19	0.38
Siprofloksasin (0.002-32 µg/ml)	>32	>32	0.016	0.032	0.19	>32
Amoksisilin/Klavulanat (0.016-256 µg/ml)	16	32	2	32	12	32
Seftazidim (0.016-256 µg/ml)	96	>256	0.125	0.38	48	>256
Seftriakson (0.002-32 µg/ml)	>256	>256	0.047	0.25	32	>256
Trimetp/Sülfametoxazol (0.002-32 µg/ml)	2	>32	0.064	0.094	0.25	>32
Piperasilin/Tazobaktam (0.016-256 µg/ml)	32	>256	0.064	32	12	>256
Kloramfenikol (0.016-256 µg/ml)	4	>256	2	3	3	>256

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

K.pneumoniae, gerek infeksiyon etkeni ve gerekse kolonizan bakteri olarak hastanede yatan hasta örneklerinden sıkça soyutlanmaktadır. Hastane kökenli *K.pneumoniae* suşları birçok antibiyotiğe dirençlidir. 1970’li yıllarda bu suşların çoğu sadece aminoglikozid grubu antibiyotiklere dirençli suşlardı. 1980’li yıllarda *Klebsiella* ve *E.coli*’de belirlenen bazı enzimlerin yeni kuşak sefalosporinler ve aztreonamı inaktive ettiği gözlenmiştir. TEM-1, TEM-2 veya SHV-1 enzimlerinden köken alan bu enzimler ESBL olarak adlandırılmıştır. *K.pneumoniae* suşlarında ESBL’lerin sık görülmesinin sebebi; deri ve yüzeylede diğer enterik bakterilere göre daha uzun süre canlı kalabilmeleri, plazmid ile aktarılabilmeleri ve spontan mutasyonların daha sık görülmesidir (5, 6, 70, 71).

ESBL’ler ilk olarak Avrupa’dan, daha sonra artan oranda dünyada diğer bölgelerden bildirilmiştir. Pek çok patojen gram-negatif bakteride tespit edilse de ESBL enzimleri en yüksek oranda *K.pneumoniae* izolatlarında görülmektedir (72). Üçüncü kuşak sefalosporinlerin aşırı kullanımı, ESBL için seçici etki oluşturmakta ve bu enzimleri üreten suşların yatan hastaların solunum ve gastrointestinal sistemlerinde kolonizasyonunu hızlandırmaktadır. Yoğun beta-laktam antibiyotik kullanımı, invaziv girişimler, kateterizasyon, geniş yanıklar ve büyük cerrahi müdahaleler, ESBL pozitif suşlarla gelişen bakteremi veya sepsis olguları için başlıca risk faktörleridir (73, 74). Son yıllarda hastane epidemilerinde ESBL üreten *Klebsiella spp.* ve *E.coli*’ler gözlenmeye başlanmıştır. Türkiye’de ESBL sentezleyen izolatlar ilk kez 1992 yılında bildirilmiştir (66).

ESBL üreten *K.pneumoniae* izolatları, ESBL genlerinin diğer türlere ve cinslere aktarımından sorumludur. ESBL üreten *K.pneumoniae* izolatlarının, aynı zamanda çoklu ilaca dirençle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden hastanelerde ESBL üreten *K.pneumoniae* izolatlarının tanımlanması, uygun şekilde tedavi edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir (5, 75).

ESBL varlığına ilişkin veriler yıldan yıla, ülkeden ülkeye, bir ülkenin çeşitli bölgelerinde hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir (76-78). Ayrıca ESBL tipleri de bölgeden bölgeye değişmektedir. Örneğin Avrupa’da *Klebsiella* suşlarının ESBL’leri genellikle SHV-5 tipi iken ABD’de TEM-10 ve TEM-12 daha yaygın olarak görülmektedir (6). 1993’te “National Nosocomial Infection Study System”de test edilen, *K.pneumoniae* suşlarının %5’inin ESBL pozitif izolatlar olduğu rapor edilmiştir (11).

Avrupa’da ise bu oran daha yüksektir. 2000 yılında Fransa ve İngiltere’de yapılan bir çalışmada *Klebsiella* suşlarının %14-16’sının ESBL üreten suşlar olduğu ortaya konmuştur (6). Bazı bölge ve hastanelerde bu oran %25-40’a ulaşabilmektedir. Türkiye’de yapılan çalışmalarda *K.pneumoniae* suşlarında ESBL sıklığı %40-90 arasında değişmektedir (12).

Ülkemiz’de Abacıoğlu ve ark.(79) yenidoğan ünitesinde 34 hasta arasında gözlenen salgında etiyolojik ajan olarak ESBL oluşturan *K.pneumoniae* soyutlamışlardır. Benzer şekilde Trakya Üniversitesi Hastanesi Yenidoğan Ünitesinde gelişen epidemiden de ESBL üreten *K.pneumoniae* sorumlu tutulmuştur. Ultrasonda kullanılan jelden yayılan SHV-5 ve TEM-1 kökenli *K.pneumoniae* epidemisi bu bakterinin kolay ve hızlı yayıldığını göstermektedir (70).

Du ve ark.(80) yaptıkları çalışmada nozokomiyal bakteremili hastalardan izole ettikleri *Klebsiella* suşlarının %28’inde ESBL varlığını bildirmişler. Shehabi ve ark.(81) çalışmalarında çeşitli kültürlerden izole edilen *Klebsiella spp.* suşlarında ESBL üretimini %70 oranında bulmuşlardır. Yoğun bakım ve diğer ünitelerden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında Villegas ve ark.(82) ESBL pozitifliğini kombine (modifiye) disk sinerji metoduyla sırasıyla % 32.6 ve %29.8 olarak tespit etmişlerdir.

Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Tünger ve ark.(83) çalışmalarında hastane infeksiyonu tanısı konan ve yoğun bakım hastalarından izole edilen *Klebsiella* suşlarında ESBL aktivitesini ÇDST yöntemiyle %49.3 olarak bulmuşlardır. Dereli ve ark.(84) ise yoğun bakım ünitesinden izole ettikleri 23 *K.pneumoniae* suşunun 22’sinde (%97) ESBL pozitifliği bulmuşlar. Nozokomiyal *K.pneumoniae* suşlarında Tünger ve ark.(77) ÇDST yöntemiyle ESBL oranını % 41.7 olarak tespit etmişlerdir. ÇDST yöntemiyle yapılan diğer çalışmalarda, ESBL oranı %30-52 arasında tespit edilmiştir (85-89). Küçükateş (90)’in çalışmasında ise ESBL oranı *K.pneumoniae* suşlarında %57.5 olarak bulunmuştur. Hastane infeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* suşlarında Kuzucu ve ark.(23) %61.8, Gülay ve ark.(91) %88.6, Gültekin ve ark.(70) %54 oranında ESBL pozitifliği belirlemişlerdir. Laboratuvarımızda daha önce yaptığımız çalışmada değişik klinik örneklerden izole ettiğimiz *Klebsiella spp.* izolatlarında ESBL pozitifliği %56.5 olarak saptanmıştır. Hastane infeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatlarında Yücesoy ve ark.(92) ise E-test metoduyla %57.1 oranında ESBL tespit etmişlerdir.

Tüm bu çalışmaların sonuçlarında da görüldüğü gibi bakterilerin izole edildiği hastanelere, servislere göre ESBL üretim oranları değişmektedir. Yaptığımız çalışmada kan kültürü izolatu *K.pneumoniae* suşlarında ESBL üretim oranı kombine (modifiye) disk

sinerji testi ile %63.7 olarak bulundu. Bu oran yurt içi (23, 70, 90) ve bazı yurt dışı (81) çalışmalarla uyumlu bulundu. Ayrıca *K.pneumoniae* izolatlarında ESBL oranlarının yıllara, bölgelere ve izole edildikleri hastane birimlerine göre değişebileceği de unutulmamalıdır.

β -laktamazlar, kromozomal, plazmid ya da transpozon kökenli olabilirler ve kolaylıkla yayılabilirler. Bu direnç genlerinin seçilmesi ve yayılması için en uygun ortam antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı hastanelerdir. Du ve ark.(80)'nin çalışmasında üçüncü kuşak sefalosporinlerle yapılan tedavinin ESBL üretimi açısından tek bağımsız risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Vahaboğlu ve ark.(93)'nin çalışmasında ESBL direncinin en çok saptandığı birim yoğun bakım ünitesi olmuştur.

Bizim çalışmamızda ESBL aktivitesi olumlu saptanan *K.pneumoniae* suşlarının en yoğun izole edildiği bölümler ve ESBL oranları; Göğüs Hastalıkları %100, Üroloji %90, Reanimasyon %78.3 ve Nöroşirürji %66.7 olarak bulundu. Bu çalışmada ESBL aktivitesi olumlu saptanan *K.pneumoniae* suşlarının %76.9'u dahili servislere ait bulundu bunların da %56'sının servislerin yoğun bakımlarına ait olduğu tespit edildi. Cerrahi bölümlerde yatan hastalardan gelen kan kültürlerinden izole edilen, ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarının oranı ise %33.1 olarak bulundu. Bu oranlar arasındaki farkın nedeni klinikler arasında hasta profili, hastaya uygulanan geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ve süresi, kateterizasyon uygulanması ve süresi, hastane personeli ile hasta ilişkisi gibi faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

ESBL oluşturan *Klebsiella* türlerinin in-vitro tespit edilebilmesi için National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ya da yeni adı ile CLSI; β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü sinerjisinin gösterilmesi temeline dayanan tarama ve fenotipik doğrulama testini önermiştir (94). ÇDST ESBL tayininde halen en yaygın, en ucuz ve en kolay yöntem olduğu için ülkemizde ve pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmaktadır (47, 75). ÇDST, bazı yazarlarca çok düşük düzeydeki β -laktamaz üretimini bile belirleyebildiği ve bu nedenle önerilebilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir (54). ÇDST, laboratuvarlarda rutin antibiyogram disklerinin dizilimleri değiştirilerek, ESBL tarama testi olarak uygulanmaktadır. Ancak diskler arasındaki mesafe konusunda halen standardizasyon sorunu vardır ve tüm ESBL'leri saptayamamaktadır. E-test yöntemi ise disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinin kombinasyonudur ve yakın zamanda kullanılmaya başlanmıştır.

Eskitürk ve ark.(95) akut bakım gerektiren hastalardan izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarında ÇDST yöntemi ile ESBL oranını %52, E-test metodu ile de %52 olarak

bulmuşlardır. Hastane infeksiyonu izolatu *K.pneumoniae* suşlarında Abacıoğlu ve ark(96). ÇDST ile %50, E-test ile de %62.5 ESBL pozitifliği bulmuşlardır. Kaçmaz ve ark(75). ise hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella spp.* ve *E.coli*'de ÇDST'nin fenotipik doğrulama testine göre duyarlılık ve özgülüğünü sırasıyla %82 ve %85 olarak bulmuşlardır Yapılan değişik çalışmalarda ESBL üretimini saptamada ÇDST ve E-test yöntemleri karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır (37). Bu testlerin karşılaştırılması ile ilgili başka sonuç ise Cormican ve ark.(97) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada, ESBL saptanmasında tarama testi olarak ÇDST'ni %87, E-test yöntemini %100 duyarlı bulmuşlardır (97).

Steward ve ark.(98) 139 ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşundan 117 (% 84) izolatu kombine (modifiye) disk sinerji yöntemde pozitif bulmuşlardır. Bunların 104'ünde (% 89) hem sefotaksim hem de seftazidim ESBL'yi belirlemekte, 11'inde (%9) sadece seftazidim ve 2'sinde (% 2) sefotaksim belirleyicidir (98). Vercauteren ve ark.(99) ise, E-test ESBL stripleri ile ESBL ürettiği bilinen suşların % 81'i saptanabilirken, ÇDST için %97, üç boyutlu test için ise %91 olduğunu bildirmişlerdir. Duyarlılıkları ve özgüllükleri için farklı bildirimler vardır. Günaydın ve ark.(100) 77 *Klebsiella spp.* suşunda yaptıkları çalışmada ÇDST ile %46.8, E-Test ile %55.8 ESBL pozitifliği belirlemişlerdir. Akçam ve ark.(37) 40 *Klebsiella* suşunun ÇDST ile %35'inde, E-test ile %37.5'inde ESBL saptamışlardır.

CLSI, ESBL saptanmasında tarama testi ile birlikte fenotipik doğrulama testinin uygulanmasını önermektedir (94). Bu çalışmada, fenotipik doğrulama testi olarak, kombine (modifiye) disk sinerji testi ile ESBL oranı saptanmıştır. Tarama testi olarak uygulanan ÇDST ve yakın zamanda kullanıma giren E-test yöntemi, kombine (modifiye) disk sinerji testi ile karşılaştırılıp duyarlılık, seçicilik ve uyumlulukları araştırılmıştır. Çalışmamızda; 102 *K.pneumoniae* suşun ÇDST yöntemiyle %61.8, CT/CTL E-test yöntemiyle %59.8, kombine disk (modifiye) sinerji testi ile %63.7'sinde ESBL varlığı tespit edildi. Kombine (modifiye) disk sinerji testine göre duyarlılıkları; ÇDST'de %96.9, CT/CTL E-test yönteminde %93.9 olarak bulundu. Seçicilikleri ise; her iki test için %100'dür.

ÇDST'nin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Örneğin bazı suşlar tarafından yüksek düzeyde oluşturulan sefalosporinazlar sinerjik etkinin görülmesini engelleyebilmektedir. Diskler arasındaki uzaklığın da deneyin sonucunu etkilediği, bazen ESBL oluşturan suşlarla yapılan ve diskler arasındaki uzaklığın 30 mm olarak ayarlandığı deneylerde yanlış negatif sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Ayrıca klavulanat diskinde meydana gelebilecek potens kaybının da dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir (101).

Çalışmamızda ÇDST'inin duyarlılığı fenotipik doğrulama testine göre %96.9, seçiciliği ise %100 olarak tespit edildi. Yüksek oranda duyarlılık ve seçiciliğin belirlenmesinin sebebi; diskler arası mesafeye dikkat edilmesi ve gerektiğinde uzaklığın 20mm'ye indirilerek tekrar çalışılmasındandır. Diğer bir faktör de indikatör antibiyotiklerin tümünün (aztreonam, seftriakson, seftazidim, sefotaksim) ÇDST'inde kullanılması olabilir. Buna rağmen ÇDST'inde iki suş doğrulama testine göre yalancı negatiflik göstermiştir.

E-testin ise duyarlılığı %93.9, seçiciliği ise %100 olarak tespit edilmiştir. İki test de doğrulama testine göre yüksek duyarlılık ve seçicilik göstermesine rağmen E-testteki farklılığın sebebi; E-testin düşük miktardaki ESBL'leri saptayamaması ve sadece CT/CTL E-test stripleriyle çalışılmasının olabileceği tahmin edilmiştir. TZ/TZL E-test ile birlikte kullanıldığında duyarlılığın biraz daha artabileceği düşünülmüştür. Ancak E-testin maliyetinin yüksek olması kullanımını engellemektedir. Bu çalışmada ESBL belirlenmesinde kullandığımız yöntemler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu da yapılan diğer çalışmalarla (37, 75, 95) uyumlu bulunmuştur.

ESBL oluşturan bakterilerin neden olduğu kan dolaşımı infeksiyonlarında, karbapenemlere alternatif olabilecek tedavi seçenekleri halen tartışılmaktadır. ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarının neden olduğu bakteremi veya sepsis olgularında karbapenemler dışındaki etkin antibiyotiklerle yapılan tedavilere rağmen mortalite oranı yüksek seyretmektedir (102).

Gioia ve Livermore(103), ESBL üreten yoğun bakım kökenli *Klebsiella* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını incelemiş ve dört yıllık bir dönemde bu suşlarda kinolon ve aminoglikozid direncinin iki-üç kat, piperasilin/tazobaktam direncinin ise yaklaşık iki kat arttığını ve yüksek düzeyde dirençli suşların ortaya çıktığını; ayrıca karbapenem MİK'lerinin 2-4 µg/ml'lik üst sınır düzeylerine ulaştığını saptamışlardır. Bu sonuçlar, ESBL infeksiyonlarında kullanılacak antibiyotiklerin etkinliğinde hızlı bir erozyon olduğunu göstermektedir (103).

Leleu ve ark.(104) piperasilin/tazobaktam kombinasyonunun, ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarının neden olduğu endokardit ve menenjit gibi infeksiyonların sağaltımında düşük dozlarda dahi etkin olabileceğini bildirmişlerdir.

Diğer taraftan Gioia ve ark.(105) ESBL üreten *Klebsiella* suşlarında piperasilin/tazobaktam kombinasyonunun etkinliğinin çok değişken olduğunu ve ayrıca duyarlılık oranlarının tazobaktam komponentinin konsantrasyonuna göre farklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Ambrose ve ark.(106)'nın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, ESBL üreten *Escherichia coli* suşlarının piperasilin-tazobaktam duyarlılığı *Klebsiella* suşlarından daha yüksek bulunmuş ve her iki antibiyotiğe de duyarlı *K.pneumoniae* suşlarının yol açtığı infeksiyonlarda, sefepimin, piperasilin-tazobaktama göre daha düşük dozlarda ve daha uzun zaman aralıklarıyla etkin olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Ayrıca, iki yıllık bir takipte, piperasilin-tazobaktam kullanılan ESBL infeksiyonlarının yarısından fazlasında tedavi başarısızlığının izlenmesi üzerine, bu ajanın rutin olarak ESBL infeksiyonlarında kullanımının uygun olmayacağı saptanmıştır (107).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşların neden olduğu kan dolaşımı infeksiyonlarının tedavisinde mikrobiyolojik çalışmalara rağmen bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Bunlardan biri, Paterson ve ark.(108)'nin yaptığı çok merkezli çalışmada belirtildiği gibi; in-vitro testlerde etkili bulunan antibiyotiklerin klinik kullanımda etkisiz kalmasıdır.

Tedavide karşılaşılan ikinci problem ise inokulum etkisi olup, standart mikrobiyolojik inceleme esnasında yapılan antibiyogramda antibiyotiklerin 10^5 cfu/ml bakteri yoğunluğunda test edildiklerinde duyarlı sınırlarda bulunan MİK değerleri, bakteri inokulumunun 10^7 cfu/ml'e çıkması ile belirgin olarak artmaktadır. Thomson ve Moland (109), ESBL üreten suşlarda inokulum etkisi ile sefalosporinlerin MİK değerlerinin yaklaşık 128 kat, piperasilin/tazobaktam MİK değerinin ise 4-64 kat arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar karbapenem MİK değerlerinin inokulum etkisinden etkilenmediği veya minimal düzeyde etkilendiğini bildirmişlerdir (109).

Mumcuoğlu ve ark.(110) ÇDST'i ile tespit ettikleri ESBL pozitif suşların antibiyotiklere dirençliliğini, negatiflere göre daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir. ESBL negatif ve pozitif kökenlerde amikasin, aztreonam, kloramfenikol, imipenem, sefoksitin, siprofloksasin ve trimetoprim/sülfametoksazol duyarlılığını disk difüzyon ile araştırmışlar. ESBL pozitif suşların direncini sırasıyla %5.8, %28.8, %61.5, %0, %28.8, %5.8, %80.8 olarak, ESBL negatif suşların direncini ise sırasıyla %0, %11, %39.7, %0, %19.2, %3.4, %54.8 olarak saptamışlardır. Çalışmalarında en etkili antibiyotikler olarak amikasin, imipenem ve siprofloksasini bulmuşlardır (110).

Yavuzdemir ve ark.(71) ise ÇDST'i ile tespit ettikleri 50 ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarının dirençlilik oranlarını disk difüzyon yöntemiyle incelemişler. Dirençli suş sayısı ve oranlarını; amikasin 25 (%50), gentamisin 33 (%66), netilmisin 39 (%78), tobramisin 43 (%86), trimetoprim/sülfametoksazol 36 (%72) tetrasiklin 28 (%56),

siprofloksasin 14 (%28), sefepim 18 (%36), piperasilin/tazobaktam 14 (%28) ve meropenem 3 (%6) olarak tespit etmişlerdir (71).

Babini ve Livermore (48) *Klebsiella* türlerinde MİK yöntemiyle yaptıkları duyarlılık testlerinde amikasine %61, gentamisine %72, piperasilin/tazobaktama %63, siprofloksasine %31 oranında direnç belirlemişler ve ESBL yapan suşların direncinin, yapmayanlara göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Löker ve ark (78) ÇDS testiyle *Klebsiella* türlerinde %42.6, *E.coli*'de ise %3.1 olarak ESBL pozitifliği saptamışlardır. Bu izolatların %80'ini seftazidime, %68'ini sefotaksime, %88'ini aztreonama dirençli bulurken, %100'ünü imipeneme duyarlı bulmuşlardır (78).

Yaptığımız çalışmada kombine (modifiye) disk sinerji testi ile tespit ettiğimiz 65 ESBL pozitif kan izolatu *K.pneumoniae* suşlarında direnç oranları imipenem 0 (%0); amikasin 18 (%27.7), kloramfenikol 27 (%41.5), trimetoprim/sülfametoksazol 32 (%49.2), siprofloksasin 36 (%55.4), piperasilin/tazobaktam 39 (%60), amoksisilin/klavulanat 46 (%70.8), gentamisin 48 (%73.9), seftriakson 58 (%89.2), seftazidim 61 (%93.9), olarak tespit edildi. Çalışmamız; antibiyotik direnç oranlarının suşların izole edildiği birimlere ve birimlerde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklere göre değiştiğinin de göz önüne alınmasıyla diğer çalışmalarla uyumlu olarak bulundu. Çalışmamızda sadece siprofloksasine karşı direnç oranı (%55.4) diğer çalışmalardan yüksek bulundu. Bu yüksek direncin sebebi olarak hastanemizde kinolonların aşırı kullanımının olabileceği düşünülmektedir. Önceleri gentamisin etkili bir antibiyotikti ancak yoğun bakım üniteleri ve hastanelerin diğer birimlerinde kontrolsüz kullanımları sonucu bu antibiyotiklere de direnç gelişmiştir.

Çalışmamızda ise ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarında gentamisin direnci literatürlerle uyumlu olarak %73.9 olarak bulundu ve ESBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarında amikasine direnç %27.7 olarak tespit edildi. Şu an için etkili görünmekle birlikte yoğun bakım ünitelerinde yoğun kullanımları sonucu gelecekte bu antibiyotiğe karşı da yüksek direnç oranlarından bahsedileceğine kesin gözüyle bakılmaktadır.

Bu çalışmada ESBL pozitif izolatların antibiyotik direnç oranları diğer çalışmalarla (48, 71, 78) uyumlu şekilde negatifle göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Yaptığımız bu çalışmada ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarında imipeneme karşı dirence rastlanmamıştır ve en etkili antibiyotik imipenem olarak tespit edilmiştir, ikinci olarakta amikasin etkili bulunmuştur.

Yakupoğulları ve ark.(27) kan kültürlerinden soyutladıkları 56 *K.pneumoniae* suşunun 35'inde (%62.5) ÇDST ile ESBL saptamışlar ve E-test yöntemiyle

antimikrobiyallerin bu suşlara karşı MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini tespit etmişlerdir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla piperasilin/tazobaktam; 96-256µg/ml, sefoperazon/sulbaktam; 128->256µg/ml, tikarsilin/klavulanat; 192->256µg/ml, amoksisilin/klavulanat; 192->256µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Pena ve ark.(26) kan izolatu ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarına karşı β-laktam antibiyotiklerin aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla; amoksisilin/klavulanat; 8-16µg/ml, piperasilin/tazobaktam; 128->256µg/ml, seftazidim; 128->256µg/ml, seftotaksim; 8-64µg/ml, aztreonam; 128->256µg/ml, imipenem; 0.12-0.25µg/ml olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla; amikasin (12-48µg/ml), gentamisin (64-256µg/ml), imipenem (0.19-0.94µg/ml), siprofloksasin (>32->32µg/ml), amoksisilin/klavulanat (16-32µg/ml), seftazidim (96-256µg/ml), seftriakson (>256->256µg/ml), trimetoprim/sülfametoksazol (2->32µg/ml), piperasilin/tazobaktam (32->256µg/ml), kloramfenikol (4->256µg/ml) olarak belirlendi. Orta duyarlı suşlarında dirençli olarak kabul edildiği çalışmamızda imipenemin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri duyarlılık sınırları içinde bulundu. Bunun dışında amikasinin, trimetoprim/sülfametoksazol ve kloramfenikolün MİK₅₀ değerleri duyarlılık sınırları içerisinde MİK₉₀ değerleri ise dirençlilik sınırları içerisinde saptandı. Diğer antimikrobiyal ajanların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri dirençlilik sınırları içerisinde tespit edildi.

β-laktam/β-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarında dahil olmak üzere ESBL pozitif kan izolatu *K.pneumoniae* suşlarına karşı β-laktam antibiyotiklerin, siprofloksasinin, gentamisinin seftazidim ve seftriaksonun etkinlikleri istenilen düzeyde değildir. Çalışmamızdaki MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini gözden geçirdiğimizde yapılan çalışmalarla uyumlu bulundu.

Piperasilin/tazobaktam kombinasyonundaki MİK₅₀ değerindeki farklılığın piperasilin/tazobaktam kombinasyonunun etkinliğinin çok değişken olması ve sık kullanılmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür. Siprofloksasin ve gentamisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerindeki yüksekliğin yine yoğun kullanımla ilişkili olduğu ayrıca ESBL direnç genlerini taşıyan plazmidlerle beraber siprofloksasin ve gentamisin antibiyotik direnç genlerinin de taşınmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada kan kültürü izolatu 102 *K.pneumoniae* suşunda kombine (modifiye) disk sinerji testi ile %63.7 oranında ESBL varlığı belirlenmiştir. ÇDST ve E-testinin, kombine (modifiye) disk sinerji testine göre duyarlılık ve seçicilikleri arasında anlamlı bir

fark bulunamamıştır. Tutarlılık analizleri de üç testin birbirleri ile uyumlu olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). ESBL üreten *K.pneumoniae* suşlarının antibiyotik direnç oranları $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri ESBL üretmeyen *K.pneumoniae* suşlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$) bulundu. ESBL üreten suşlara karşı imipenem ve amikasin etkili antibiyotikler olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ÇDST'nin, kolay, ucuz bir yöntem olduğu, ancak ESBL saptanmasında tek başına kullanıldığında tüm ESBL'leri saptayamadığı görülmüştür. E-test ise pahalı bir yöntem olmasına rağmen düşük düzeydeki ESBL'leri belirleyememektedir. Moleküler testler dışında hiçbir test ESBL belirlenmesinde tek başına %100 duyarlılıkta değildir. Bu çalışmada imkan sağlanamadığı için moleküler yöntemlerle ESBL oranları ve tipleri araştırılamamıştır. Sonuç olarak tedavisi pahalı ve güç hastane infeksiyonlarına neden olduklarından *K.pneumoniae* suşlarında ESBL üretim oranlarının sürekli izlenmesi, yayılımlarının önlenmesi için; geniş spektrumlu β -laktam antibiyotiklerin dikkatli kullanılması, kolonize veya infekte hastaların izolasyonu, risk altındaki hastane bölümlerinde dikkatli ve ayrıntılı sürveyans çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu çalışmada ESBL belirlenmesinde ÇDST, E-test ve kombine (modifiye) disk sinerji testi birbirleriyle uyumlu bulundu. E-testin pahalı olması, moleküler yöntemlerin rutin olarak uygulanmalarının zorluğu ve pahalılığı göz önüne alındığında, ESBL saptanmasında rutin antibiyogram disklerinin dizilimlerinin değiştirilip ÇDST olarak yapılması ve şüpheli suşlara doğrulama testi olarak kombine (modifiye) disk sinerji testinin uygulanmasının doğru olacağı düşünülmektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada, yatan hastaların kan kültürü örneklerinden soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarında ESBL sıklığı, ESBL saptanmasında çift disk sinerji testi (ÇDST), kombine (modifiye) disk sinerji testi, E-testinin karşılaştırılması ve antimikrobiyal duyarlılığın araştırılması amaçlanmıştır.

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bakterioloji Bölümüne çeşitli kliniklerden gelen yatan hastaların kan kültür örneklerinden 102 *Klebsiella pneumoniae* suşu izole edilmiştir. Kombine (modifiye) disk sinerji testi ile %63.7 oranında ESBL varlığı tespit edilmiştir. Çift disk sinerji testi ve CT/CTL E-test yöntemlerinin kombine disk yöntemine göre seçicilikleri %100, duyarlılıkları ise çift disk sinerji testinde %96.9, CT/CTL E-test yönteminde ise %93.9 olarak saptanmıştır. Üç yöntemin tutarlılık analizlerinde ise istatistiksel olarak birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür Gözlenen tutarlılıkları %95'in üzerinde bulunmuştur ($p<0.05$). Antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında; tüm suşlar imipeneme duyarlı olarak belirlenmiştir. İmipenem haricindeki antimikrobiyal ajanlara karşı, ESBL üreten izolatların direnç oranları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ESBL üretmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) derecede daha yüksek bulunmuştur. Tüm suşlar içinde en çok duyarlılık imipenem dışında amikasin (%81.4) ve kloramfenikolde (%71.6) gözlenmiştir. ESBL üreticiliğinin yüksek oranda gözlenmesi ve antimikrobiyal ajanlara karşı, ESBL üreten izolatların çok yüksek direnç oranları, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında ESBL saptama testlerinin yapılmasını zorunlu kılmaktadır.

ESBL tespitinde, rutin antibiyogramlarda disk dizilimleri değiştirilerek uygulanan ÇDST, hızlı, ucuz ve güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilmiş ve şüpheli suşlara ek olarak kombine (modifiye) disk sinerji testinin de uygulanması ile duyarlılığın daha da yükselebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar, antimikrobiyal duyarlılık

7. SUMMARY

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES AND DETECTION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCTION WITH THREE METHODS

This study was carried out to detect the antimicrobial susceptibility and to compare the the double disc synergy test, combined disc synergy test, E-test method for detection Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patient's blood cultures.

One hundred and two *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated from blood samples that were taken from different clinical departments of Central Microbiology's Bacteriology section of Selçuk University Meram Medical School. ESBL was observed in 63.7 % of isolates with combined disc synergy test. The specificity of Double disc synergy test and CT/CTL E-test method with respect to combined disc synergy test was 100%, sensitivity was 96.9% in double disc synergy method and 93.85% in CT/CTL E-test method. All tested three methods were statistically consistent with each other with a 95% consistency ($p < 0.05$). All of the strains isolated were susceptible to imipenem. Furthermore ESBL positive strains were more resistant to antibiotics than it's negative strains, also the values of MIC₅₀ and MIC₉₀ were higher in it's positive strains ($p < 0.005$). Besides imipenem the most susceptible antibiotics were amikacin (susceptibility rate 81.4%) and chloramphenicol (susceptibility rate 71.6%). High resistance rates were seen in ESBL positive strains, it's must be investigated in all hospital bacteriology laboratories. For ESBL detection; double disc synergy test is cost-effective, simple and sensitive but especially for suspected strains combined disc synergy test could be used with double disc synergy test to increase the sensitivity of the tests.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Extended Spectrum β -Lactamases, antimicrobial susceptibility

8. KAYNAKLAR:

1. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Enterobacteriaceae*. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis, Missouri 2002; 365-76.
2. Bilgehan H. *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi 1992; 425-51.
3. Erdem B. *Enterobacteriaceae*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. Güneş Kitabevi, 1999; 471-80.
4. Turhan V. *Enterobacteriaceae*. Enterobakterilere bağlı İnfeksiyonlar. [http://www.gata.edu.tr/kitap/3 BOLUM/1. 4:375-84](http://www.gata.edu.tr/kitap/3%20BOLUM/1.4:375-84)
5. Podscun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 589-603.
6. Aydoğan H, Başustaoğlu A. Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2000; 4: 135-43.
7. Gouby A, Neowirth C, Bourg G, Bouziges N, Charles-Nurit MJ et al. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. J Clin Microbiol 1994; 32: 301-5.
8. Di Martino P, Bertin Y, Girardeau P, Livrelli V, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. Infect Immun 1995; 63: 4336-44.
9. Pekşen Y. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi. İnfeksiyon Hastalıkları (Klinik) Dergisi 1993; 6: 100-1.
10. Ulutürk R, Soysal H. F, Boztaş Z, Ünlüer E, Toktaş G, Gürbüz C. Multirezistan *Klebsiella pneumoniae* suşunun neden olduğu hastane infeksiyonu. Klimik Dergisi 2000; 3: 91-3.
11. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 11: 6-9.
12. Köksal İ. Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarının tedavisi. Klimik Dergisi. 2000; 13 (Özel Sayı): 21 – 2.
13. Yüce A. Nozokomiyal pnömonide sağaltım. Klimik Dergisi. 2000; 13 (Özel Sayı): 7 – 11.
14. Doğanay M. Nozokomiyal bakteriyemilerde tedavi. Klimik Dergisi. 2000; 13 (Özel Sayı): 16-8.

15. Pekşen Y. Hastane infeksiyonları epidemiyolojisi. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları 2002. Samsun İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği Simad Yayınları No:1.
16. Öngen B. Hastanede sorunlu mikroorganizmalar. Gram-negatif bakteriler. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Samsun 2003: 1-9.
17. Verbist L. Epidemiology and sensitivity of 8625 ICU and hematology/oncology bacterial isolates in Europe. Scand J Infect Dis 1993; 91(Suppl): 14-24.
18. Gür D, Ünal S. Yoğun bakım ünitelerinde izole edilen gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. Flora 1996; 1: 153-9.
19. Aydemir H, Yalçın A, Pişkin N, Gürbüz Y, Türkyılmaz R. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ESBL üretme ve antibiyotik direnç oranları. Klimik Dergisi 2006; 19: 63-8.
20. Çetinkaya Z, Çiftçi İ. H, Aktepe O. C, Şafak B, Altındiş M. Klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg 2005; 19: 1- 4.
21. Wiener J, Quin JP, Bradford PA. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *E.coli* in nursing homes. JAMA 1999; 281(6): 517-23.
22. Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. Ann Intern Med 1993; 119: 428-30.
23. Kuzucu Ç, Kabakçioğlu M, Özışık A, Ezen FO, Acar NS. Nozokomiyal gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta laktamaz varlığının saptanması. Flora 1999; 4: 102-6.
24. Bradford PA, Urban C, Mriano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 563-9.
25. 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. Klimik Dergisi. 2000; 2: 53 – 5.
26. Pena C, Pujol M, Ardanuy C et al: Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 53-8.
27. Yakupoğulları Y, Aşçitoraman Z, Kızırgil A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten kan izolatu *Klebsiella* suşlarına karşı beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotiklerin in-vitro etkinliği. ANKEM Derg 2004; 18: 109-12.
28. Akalın H. Çoğul dirençli gram negatif bakteriler. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2000; 7: 269-87.

29. Esen Ş. ESBL'lerin epidemiyolojik özellikleri. Yeni Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar Derg Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2004: 28-34.
30. Dizbay M, Karakuş R, Arman D. Hastane infeksiyonu etkeni gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanması. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2004; 8: 40-5.
31. Combe ML, Sesboue R, Martin JP. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: A new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 26-30.
32. Baskın H. Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Klimik Dergisi 2005; 18(Özel Sayı): 9-10.
33. Öztürk R. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu İstanbul 1997; 27-51.
34. Gülay Z. Beta-laktamlara direnç mekanizmaları. Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2005:9-35.
35. Rohrer S, Berger-Bachi B. Fem ABX peptidyl transferases; a link between branched chin cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 837-46.
36. Bradford PA. Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14: 933-51.
37. Akçam F. Z, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. Klimik Dergisi 2004; 17: 47-50.
38. Gür D. Beta-laktamazlar. Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi 2. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara.2005: 35-43.
39. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
40. Ali Shah A, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristic, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamase. Research in Microbiology 2004; 155: 409-21.
41. Gür D. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar. Temel Tıptan Kliniğe. Hacettepe Tıp Dergisi. 2002; 33: 102-9.
42. Gür D. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar. Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi 2. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara.2005: 70-88.

43. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18: 657-86.
44. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002; 46:1-11.
45. Dolapçı İ. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2005; 39; 229-40.
46. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, et al. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of Extended-Spectrum β -lactamase producing *Klebsiella*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1499-505.
47. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995; 8: 557-84.
48. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 183-9.
49. Poyart C, Mugnier P, Quesne G, Berche P, Trieu-Cuot P. A Novel extended spectrum TEM-type β -lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:108-13.
50. Yorgancıgil B. Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 6:1999; 176-83.
51. Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri. *Yeni Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar*. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2004; 5-13,
52. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection* 2003; 47; 273-95.
53. Akova M. Dikkat: genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) var! *ANKEM Dergisi* (19. Ankem Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi) 2004:18 (Ek 2); 98-107.
54. Saraçlı M. A, Küçükaraaslan A, Başustaoğlu A, Özyurt M, Aydoğan H. GATA Hastanesin'de izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) pozitifliği. *İnfeksiyon Dergisi* 2001; 15 : 87-91.
55. Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34: 858-62.
56. Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains with extended-spectrum β -lactamases. *J Clin Microbiol* 1994; 32:691-96.

57. Rice LB, Yaou JDC, Klimm K, Eliopoulos GM. Efficacy of different β -lactams against an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1243-44.
58. Chaibi EB, Sirot D, Paul G et al. Inhibitor resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:447-58.
59. Knox JR: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2593-601.
60. Gür D. Genişlemiş spektrumlu (ESBL) ve plazmid kaynaklı AmpC β -laktamazlar. *Klimik Dergisi* 2005;18 (Özel sayı):147-51.
61. Danel F, Hall LM, Livermore DM: Laboratory mutants of OXA-10 beta-lactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:339-44.
62. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
63. Young D, Shin JA, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter spp.* in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1749-51.
64. Leblebicioğlu H. ESBL'lerin klinik önemi ve tedavi yaklaşımları. *Yeni Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2004;31-34,*
65. Paterson DL, Ko WC, Gottberg AV et al. Antibiotic therapy for *K.pneumoniae* bacteremia: Implications of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis* 2004;39:31-7.
66. Gür D. Hastane infeksiyonları ve antimikrobiyal ajanlara çoğul dirençli gram-negatif bakteriler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2000;4:218-25.
67. Kang CI, Kim SH, ParkWB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Chloë KW. Bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 4574-81.
68. Quinn JP. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:39-42.
69. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. *Yeni Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2004;13-25.*
70. Gültekin M, Ögünç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaş İ, Mamıkoğlu L. Hastane infeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarının genişlemiş spektrumlu β -laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 1999; 13:

515-20.

71. Yavuzdemir Ş, Aysev AD, Güriz H. Hastane kökenli ESBL yapan 50 *Klebsiella pneumoniae* suşunun bazı antibiyotiklere direnç oranları ve ESBL belirlenmesinde diskler arası mesafenin önemi. *Flora* 2001; 6: 196-200.
72. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697-704.
73. Lautenbach E, Patel JB, BilkerWB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001;32:1162-8.
74. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora Derg* 2001;6:3-9.
75. Kaçmaz B, Çakır ÖF, Aksoy A. Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması. *ANKEM Derg* 2005; 19:125-129.
76. Pai H, Lyu S, Lee HJ, Kim J, Kwon Y, Kim JV, Choe KW. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol* 1999;37:1758-63.
77. Tünger Ö, Arısoy AS, Özbakkaloğlu B, Gazi H. Nozokomiyal gram-negatif bakterilerde genişlemiş-spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Flora* 2001;6:37-41.
78. Löker K, Beşirbellioğlu B, Kısa Ö, Aydoğan H, Dizer U, Pahsa A. Hastane infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının saptanması ve izoelektrik fokuslama yöntemi ile tiplendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2001;15:319-324.
79. Abacıoğlu YH, Aslani MM, Gülay Z, İnan S, Yuluğ N. Resistotyping and plasmid profile analysis of multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated during a nosocomial outbreak. *İnfeksiyon Dergisi* 1993;9:63-8.
80. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X. Extended-spectrum beta-lactamases in producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med* 2002;28:1718-23.
81. Shehabi AA, Mahafzah A, Baadran I, Qadar FA, Dajani N. High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum beta-lactam drugs in intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000, 36: 53-6.
82. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and

- Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:217-22.
83. Tünger A, Hilmioğlu S, Dibek MA, Çavuşoğlu C, Aktaş L, Özkan F, Özinel MA. Hastane infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu β -laktamaz sıklığı. *İnfeksiyon Dergisi* 1998;12:165-8.
 84. Dereli Y, Kuzu İ, Ak Ö, Ersöz G, Benzonana N, Kul Y, Özer S. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen gram-negatif bakterilerde β -laktamazlar ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılık. *ANKEM Dergisi* 1997;11:98-103.
 85. Kiremitçi A, Durmaz G, Aybey A, Us T, Akgün Y. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarında NCCLS tarama ve fenotipik doğrulama yöntemleriyle genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) varlığının araştırılması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Kuşadası 2004; 340-4.
 86. Gönüllü N, Aktaş A, Salcıoğlu M, Bal Ç, Anđ Ö. Comparative in vitro activities of five quinolone antibiotics, including gemifloxacin, against clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:499-503.
 87. Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu β -laktamaz oranları. *ANKEM Dergisi* 2005;19:84-87.
 88. Aydemir Ş, Uluer S, Akıncı P, Tünger A, Çilli F, Özinel MA. Toplum ve hastane kökenli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin araştırılması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Kuşadası 2004;392-6.
 89. Karavelioğlu S, Karatuna O, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastane'sinde infeksiyon etkeni olarak saptanan *Enterobacteriaceae* izolatlarında ESBL bulunma sıklığı, 6. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, Toplantı kitabı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti İstanbul 2004; 161-5.
 90. Küçükateş E. Antimicrobial resistance among gram negative bacteria isolated from intensive care units in a cardiology institute in İstanbul, Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005;58:228-31.
 91. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Hastane infeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve beta-laktamaz tiplerinin incelenmesi. *Mikrobiyol Bülteni* 1996; 39:1-8.
 92. Yücesoy M, Biberöğlü K, Yuluğ N. İnfeksiyon etkeni gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin E testi ile araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 1996; 10:229-35.
 93. Vahaboğlu HM, Mülazımoğlu L, Erdem İ, Yıldırım İ, Taşer B, Avkan V. Taksim Hastane'sinde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin surveyansı. *Klinik Derg* 1993; 6: 79-82.

94. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test-sixth edition: Approved standart M2-A6, NCCLS, Villanova, PA (1997).
95. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. ANKEM Dergisi 1996; 10:14-8.
96. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. "Extended spectrum β -lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. İnfeksiyon Dergisi 1995; 9:93-8.
97. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) production strains by the E-test ESBL screen. Journal of Clinical Microbiology 1996; 34: 1880-5.
98. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ et al. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39; 2864-72.
99. Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35: 2191-97.
100. Günaydın M, Eroğlu C, Uyar Y, Çetin M, Sünbül M, Leblebicioğlu H. Determination of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) production by double disk synergy method and E test in *Klebsiella* strains. ANKEM Dergisi 2001; 15: 79-83.
101. Hoşgör M, Özkan F, Yapar N, Tünger A, Özinel MA. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde çift disk sinerji testi ile üç boyutlu yöntemin karşılaştırılması. Klimik Dergisi 1998; 11: 59-60.
102. Kim YK, Pai H, Lee HJ et al: Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1481-91.
103. Gioia SB, Livermore DM: Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000;45:183-9.
104. Leleu G, Kitzis MD, Vallois JM, Gutman L, Decazes JM. Different ratios of the piperacillin-tazobactam combination for treatment of experimental meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing the TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1994 Feb;38:195-9.

105. Gioia SB, Yuan M, Hall LMC. Variable susceptibility to piperacillin/tazobactam amongst *Klebsiella spp.* with extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:605-12.
106. Ambrose PG, Bhavnani SM, Jones RN: Pharmacokinetics-pharmacodynamics of cefepime and piperacillin-tazobactam against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended spectrum betalactamases: report from the ARREST program. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1643-6.
107. Burgess DS, Hall RG, Lewis JS, Jorgensen JH, Patterson JE: Clinical and microbiologic analysis of a hospital's extended spectrum betalactamase producing isolates over a 2-year period. *Pharmacotherapy* 2003;23:1232-7.
108. Patersson DL, Ko WC, Gottberg AV et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organism producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;6:2206-12.
109. Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in the tests with extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3548-54.
110. Mumcuoğlu İ, Gündüz T, Baydur H. *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu. *ANKEM Dergisi* 2004; 18: 9-11.