

T.C.
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEPREM SONRASI KURUM DÜZEİNDE İKİLE KALAN
SİZİLLA CİNSİ BAYTETİLMİŞİNE APTİSİMLİ
DİRENÇİNİN GENETİK KÖKENİ**

Biyolog Gülçin GÜYMEN GACAR

**Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetmeliğine Tabii Biyoloji Anabilim Dalı
Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.**

KOCAELI-2001

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEPREM SONRASI ERKEN DÖNEMDE İZOLE EDİLEN
SHİGELLA CİNSİ BAKTERİLERİN AMPİSİLİN
DİRENCİNİN GENETİK KÖKENİ

BİYOLOG
GÜLÇİN GÖYMEN GACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAELİ
2001

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEPREM SONRASI ERKEN DÖNEMDE İZOLE EDİLEN
SHİGELLA CİNSİ BAKTERİLERİN AMPİSİLİN
DİRENCİNİN GENETİK KÖKENİ

BİYOLOG
GÜLÇİN GÖYMEN GACAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Programı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: PROF. DR. HALUK VAHABOĞLU

KOCAELİ
2001

EK 3. Kabul ve Onay sayfası örneği

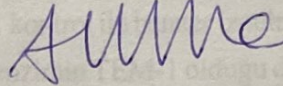
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Ayşe Wülke

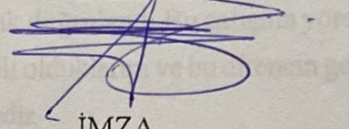
İMZA



Üye Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Ali Sazcı

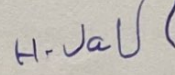
İMZA



Üye Ünvanı Adı SOYADI (Danışman)

Prof. Dr. Haluk Vahaboglu

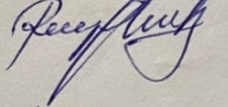
İMZA



Üye Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Recep Öztürk

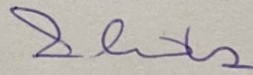
İMZA



Üye Ünvanı Adı SOYADI

Yrd. Doç. Dr. Sibel Çürümez

İMZA



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../20..



Prof. Dr. M. Nejat GACAR
Enstitü Müdürü
Mühür

ÖZET

Shigella türleri, düşük dozda enfektif olma özelliği taşıyan gram negatif bakterilerdir. Grup 2b' de yer alan hem penisilin, hem sefalosporinleri hidrolize eden klavülonik asite duyarlı TEM-1 ve SHV-1 *Shigella* türleri arasında en çok görülen b-laktamazlardır. Yaptığımız çalışmada deprem sonrası erken dönemde izole ettiğimiz *Shigella* izolatlarının 32' sinde ampisilin direnci saptandı. Otuziki suşta *Escherichia coli* J-53-2 ile transkonjugant elde edildi. İzoelektrik fokusing ile 27 suşun izoelektrik noktaları saptandı. Onsekiz suşta pI:7.4 olan fakat SHV ile amplifiye olmayan bir enzim, 3 suşta beraberinde pI:8.5 olan başka bir enzim görüldü. Bunlardan 8 suşta pI: 5.4 olan ve TEM-1 kontrol ile benzer izoelektrik noktası olan bir enzim daha saptandı. Bu suşlarda PCR ile bu enzimin TEM-1 olduğu doğrulandı. Ayrıca iki izolatta pI:7.6 yani SHV-1 ile benzer izoelektrik noktası olan bir enzim saptandı ancak bunlardan sadece birisi PCR ile SHV-1 olarak doğrulandı. Bu çalışma yöremizde *Shigella* izolatlarının yüksek düzeyde ampisilin dirençli olduklarını ve bu direncin genetik kökeninin nakledilebilir elemanlar olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

Shigella species as being infective even in low numbers to human, are important gram-negative bacteria. Beta-lactamases, those classified in the group 2b' of the latest scheme, namely TEM-1 and SHV-1 are the most prevalent enzymes found in this species. In this study, we detected ampicillin resistance in 32 *Shigella* isolates those were obtained during the surveillance study after the 1999 Marmara earthquake. From all these 32 isolates we obtained ampicillin resistant transconjugates with the recipient *E. coli* J-53-2. Among these we demonstrated the beta-lactamases from 27 with the isoelectric focusing method. In 18 isolates, enzymes with pI point of 7,4 but that is not amplified with SHV primers were detected. Three of these isolates were bearing enzymes with pI 8,5, as well. In 8 isolates, enzymes with pI point of 5,4 those were co-focusing with TEM-1 control were found. All of these transconjugates were TEM gene positive with polymerase chain reaction. In another two isolates enzymes with pI 7,6 were detected but only one of these isolates was positive for SHV gene and so confirmed as SHV-1. This study demonstrated a high ampicillin resistance among *Shigella* species in our district and the genetic basis of this resistance to be self-transmissible.

TEŞEKKÜR

Öğrettikleri ile önümde yeni ufuklar açan, beni her zaman destekleyip, fikirlerime saygı duyan, birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım aynı zamanda tez danışmanım olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Haluk Vahaboğlu' na,

Bildikleri her şeyi benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, uzun süre birlikte çalıştığım sayın Uzman Dr. Figen Kuloğlu Coşkuncan'a, sayın Uzman Dr. Özlem Tansel'e,

Master ve tez çalışmam boyunca bana her zaman destek ve yardımcı olan çok sevgili arkadaşım Suna Çelebi'ye,

Bugünlere gelebilmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili aileme ve beni her zaman destekleyen canım anneme teşekkür ederim.

Biyolog Gülçin Göymen Gacar

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enterobacteriaceae:	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Yapısı	5
2.4. Bakteri Yüzeyinin Antijenik Yapısı	6
2.5. Kapsül	7
2.6. Shigella	8
2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	10
2.8. Antibiyotik Direncinin Moleküler Genetiği29	10
2.9. Plazmidler	11
2.10. Taşınabilir (Transposable) Genetik Elemanlar:	12
2.11. DNA İntegrason Elemanları	12
2.12. Enzimatik İnhibisyon, beta-Laktamazlar ve Sınıflandırılması	13
2.13. Gram Pozitif Bakteriler	18
2.14. Gram Negatif Bakteriler	18
2.15. Anaerobik Bakteriler	19
2.16. Klinik İzolatların Dağılımı	19
2.17. Kromozomal Genlerle Belirlenen beta-laktamazlar	21
2.18. Beta-laktamazların beta-laktam Direncine Katkısı	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Bakteri İdentifikasyonu :	24
3.1.1. Kültür:	24
3.1.2. Gram boyama:	24
3.1.3. Biyokimyasal Testler:	24
3.1.3.1. TSI:	24
3.1.3.2. Sitrat kullanımı:	25
3.1.3.3. Üre hidrolizi:	25
3.1.3.4. İndol:	25
3.1.3.5. Hareket testi:	25
3.1.3.6. Serolojik tiplendirme:	25
3.2. Disk Diffüzyon Yöntemi ile Ampisilin Direncinin ve Çift Disk Sinerji Testi ile Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması	26
3.2.1. Mueller-Hinton Agarın Hazırlanması:	26
3.2.2. Bulanıklık Standardı:	26
3.2.3. Besiyerinin İnokülasyonu:	26

3.2.4. Çift disk sinerji testi:	27
3.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması	27
3.3.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması :	28
3.3.2. Stok çözeltilerin hazırlanması	28
3.3.3. İnokulum Hazırlanması:	28
3.4. Transkonjugasyon	29
3.4.1. Antibiyotikli Besiyerlerinin Hazırlanması:	29
3.4.2. İşlem:	30
3.5. Enzim İzolasyonu ve İzoelektrik Noktanın Saptanması	30
3.5.1. Enzim İzolasyonu	30
3.5.2. İzoelektrik Nokta Jelinin Hazırlanması	30
3.5.2.1. Akrilamid-bisakrilamid %25' lik stok solüsyonunun hazırlanması:	30
3.5.2.2. Riboflavinin hazırlanışı:	31
3.5.2.3. %10' luk Amonyum persülfatın (APS) hazırlanışı:	31
3.5.2.4. %25' lik Gliserol stoğunun hazırlanışı:	31
3.5.2.5. Jelin hazırlanışı:	31
3.5.2.6. İşlem:	31
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.6.1. DNA Ekstraksiyonu	32
3.6.2. Reaksiyon Karışımı:	32
3.6.3. Primerler	32
3.6.4. PCR döngüsü	33
3.7. Koloni Hibridizasyonu	33
3.7.1. Gerekli Solüsyonlar	33
3.7.1.1. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) solüsyonu	33
3.7.1.2. Denatürasyon Solüsyonu	33
3.7.1.3. Nötralizasyon Solüsyonu	34
3.7.1.4. Buffer 1	34
3.7.1.5. Buffer 2	34
3.7.1.6. Buffer 3 Solüsyonu	34
3.7.1.7. Standard Hibridizasyon Buffer	34
3.7.2. Uygulanacak Prosedür	34
4. ÇALIŞMA AKIŞI	36
5. SONUÇLAR	37
5.1. Çalışmaya alınan bakteriler:	37
5.2. Disk Diffüzyon yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması	37
5.3. Çift Disk Sinerji Yöntemi İle Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması	37
5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Orijinal Suşların Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması	37
5.5. Transkonjugasyon	39
5.6. Enzim İzolasyonu, İzoelektrik Noktanın Saptanması ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
5.7. Koloni Hibridizasyon	41
6. TARTIŞMA	42
7. KAYNAKLAR	44

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. İnsanda hastalık etkeni <i>Enterobacteriaceae</i> ailesine ait kabile ve cinsler	3
Tablo 2: Beta-laktamaz Grupları ve Genel Özellikleri (Bush-Jacoby-Medeiros)	15
Tablo 3: Beta-laktamazların Sınıflaması ve Özellikleri	17
Tablo 4. <i>Shigella</i> izolatlarının MIK değerleri	38
Tablo 5: <i>Shigella</i> izolatlarının antibiyotik minimal inhibitör konsantrasyonları (MIC 50 ve MIC 90 değerleri)	39
Tablo 6. IEF metodu ile rifampisin-ampisiline dirençli <i>E.coli</i> transkonjugatlarında saptanan enzimler	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1:** IEF Jelinde dokuz transkonjugatın beta-laktamaz enzimleri. M kuyucuğu, TEM-1 (pI 5,4) ve SHV-1 (pI 7,6); 1-3, 5 ve 6, pI 7,4 enzimler; Kuyucuk 7, pI 5,4 (TEM-1) enzimi; kuyucuk 8, pI 7,6 (SHV-1) enzimi. 40
- Şekil 2:** TEM primerleri ile PCR deneyi. M, marker; P, pozitif kontrol; N, negatif kontrol; kuyucuklar 1-7, transkonjugatlardan yapılan PCR deneyi ürünleri. 41

Yeni sınıfları da tanımlanmıştır. Genel bu bakterinin etkin olduğu enfeksiyonlara bağlı olan etken. Ancak bir bakterinin etkin olduğu enfeksiyonlardaki varlığı ve bu enfeksiyonlarda etkili olması, hastalarda daha sık ve daha geniş spektrumda ya da daha uzun süre etkili olmasıyla kullanılması yolundadır (Murray, 1991; Jacoby et al. 1991).

Yeni de ürettiği genetik ve çevresel hijyenin iyileşmesiyle olan ülkelerde hastane gastroenteritlerine ve sepsisler arasında görülen diareylerin en önemli etkenlerinden biri olmaya devam etmektedir ve küçük çocuklarda önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden, çünkü dışkı yoluyla bulaşan bu enfeksiyonların önlenmesinde temiz içme suyu, uygun kanalizasyon sistemleri, hijyenik besin ve yeterli beslenmeye başlıca sosyoekonomik faktörleri oluştururlar. Akdeniz ülkelerinde bu hastalık endemiktir. Çin ve diğer ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere göre daha az sıklıkta görülmektedir. ABD'de 1988 yılında 20.000 olgu ibareti yapılmıştır (Dupont, 1995). Dışişleri ve Sağlık Bakanlığının 1994 istatistiklerine göre bildirilen baskın diareterin olgu sayısı 2203, bu hastalardan ölenlerin sayısı ise 7'dir. Buna göre mortalite 3,57/100.000, morbidite ise 0,11/1.000.000'dir (Söyler ve Wilke, 1996). Ancak bu verilerin gerçeği yansıtmadığı da bir gerçektir. *Shigella* enfeksiyonlarının görüldüğü yerlerde, en azından *Shigella* türlerinin dağılımını da ülkeler arasında farklılık göstermekte ve zaman içinde değişmektedir. Gelişmiş endüstri ülkelerinde baskın diareterin etkenlerinden en çok *S. sonnei* izlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde *S. flexneri* en fazla izlenmektedir. Orta ve Güney Amerika, Afrika, Güney Asya ülkelerinde ise *S. dysenteriae* en çok görülür. Güney ve Orta Asya ülkelerinde bu yazının ilk 10 yılında en çok izlenen *S. dysenteriae* türü, daha sonra *S. flexneri* ve son yıllarda *S. sonnei* enfeksiyonları daha fazla görülmeye başlanmıştır (Dupont, 1995; Wilke ve ark., 1999). Ülkemizde sıklıkla benzer durum görülmüştür. 1960'li yıllarda Hacettepe Çocuk Hastanesinde izlenen *Shigella* türlerinin %30'u *S. flexneri*, %11'i *S. sonnei* oluyorken, 1989 yılında Türkiye'nin en büyük 13 merkezdeki çocuk hastanelerine, bu yıl içinde izlenen toplam 659 *Shigella* türünün %51'i *S. flexneri*, %34'ü *S. sonnei* oluyorken (Wilke ve ark., 1999). 1995 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kliniğinde izlenen *Shigella* türünün %78'i *S. sonnei*, %22'si *S. dysenteriae* türü oluyorken (Akman, 1999; Ayar ve ark., 1999; Wilke ve ark., 1999).

1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Bakterilerde çeşitli mekanizmalarla antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Antibiyotiklere direnç, hem hasta hem de hekim için bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Antibiyotiğe dirençli bir bakteri ile enfekte olan kişinin tedavi süreleri duyarlı bir bakteri ile enfekte olan kişilere göre daha uzun olmakta, bu nedenle hastanede yatış süreleri de uzamaktadır. Dirençli bir bakterinin etken olduğu enfeksiyonlara bağlı ölüm oranı, duyarlı bir bakterinin etken olduğu enfeksiyonlardaki oranın iki katı fazla olmaktadır. Ayrıca, antibiyotik direnci, hastalarda daha toksik, daha geniş spektrumlu ya da daha pahalı olan antibiyotiklerin kullanımına yol açmaktadır (Murray, 1991; Jacoby et al. 1991).

Shigella türleri, kişisel ve çevresel hijyenin zayıf olduğu gelişmekte olan ülkelerde halen gastroenteritlerin ve seyahatler esnasında görülen diyarelerin en önemli etkenlerinden biri olmaya devam etmektedir ve küçük çocuklarda önemli morbidite ve mortalite nedenidir; çünkü dışkı yoluyla bulaşan bu enfeksiyonların önlenmesinde temiz içme suyu, uygun kanalizasyon sistemleri, hijyenik besin ve yeterli beslenme başlıca sosyoekonomik faktörleri oluştururlar. Akdeniz ülkelerinde bu hastalık endemiktir. Gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere göre daha az sıklıkta görülürler. ABD’inde 1988 yılında 30.000 olgu ihbarı yapılmıştır (Dupont, 1995). Ülkemizde Sağlık Bakanlığının 1994 istatistiklerine göre bildirilen basilli dizanterili olgu sayısı 2203, bu hastalıktan ölenlerin sayısı ise 7 dir. Buna göre morbidite 3.57/100.000, mortalite ise 0.11/1.000.000 dur (Söyletir ve Willke, 1996). Ancak bu verilerin gerçeği yansıtmadığı da bir gerçektir. *Shigella* enfeksiyonlarının görülme sıklığı yanında, etken olan *Shigella* türlerinin dağılımı da ülkeler arasında farklılık göstermekte ve zaman içinde değişmektedir. Gelişmiş endüstri ülkelerinde basilli dizanteri olgularından en sık *S. sonnei* izole edilirken gelişmekte olan ülkelerde *S. flexneri* en fazla etkindir. Orta ve Güney Amerika, Afrika, Güney Asya ülkelerinde ise *S. dysenteriae* en çok görülen tiptir. Gelişmiş Avrupa ülkelerinde bu yüzyılın ilk 25 yılında en sık etken *S. dysenteriae* iken, daha sonra *S. flexneri* ve son yıllarda *S. sonnei* enfeksiyonları daha fazla görülmeye başlamıştır (Dupont, 1995; Willke ve ark., 1999). Ülkemizde saptanan benzer durum şöyledir; 1960’ lı yıllarda Hacettepe Çocuk hastanesinde izole edilen *Shigella* türlerinin %80’nini *S. flexneri*, %13’ünü *S. sonnei* oluştururken, 1989 yılında Türkiye’nin on ilinden 13 merkezden alınan sonuçlara göre, bu yıl içinde izole edilen toplam 659 *Shigella* suşunun %51’ini *S. flexneri*, %34’ünü *S. sonnei* oluşturmaktadır (Willke ve ark. 1999). 1995 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk kliniğinde izole edilen *Shigella*’ların %78’i *S. sonnei*, %22’si *S. flexneri* olarak saptanmıştır (Akman, 1960; Aysev ve ark. 1994; Willke ve ark.1999).

Şigelloz *Shigella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan genellikle kanlı mukuslu ishal, kramp tarzında karın ağrıları ve tenesmusla kendini gösteren akut enfeksiyöz bir enterittir. İnsandan insana fekal oral yolla bulaşır. Akut enfeksiyonlu hastalar tedavi edilmezlerse 1-4 hafta süreyle *Shigella* bakterilerini dışkılarıyla çıkarırlar, diğer yandan bazı kişiler enterik taşıyıcıdırlar. Bu yüzden hem hasta kişiler, hem de taşıyıcılardan sağlıklı ve duyarlı kişilere bakteriler bulaşabilir (Keusch and Bennish, 1991; Keusch, 1992). Basilli dizanteri terimi şigellozla eş anlamlı kullanılır. Ayrıca şigelloz tedavi edildiğinde gastrointestinal sistemik semptomlar azalır ve enfekte organizmalarla dolu dışkılama periyodu kısalmır. Bundan dolayı basilli dizanterinin tedavisi vakit kaybetmeden uygulanmalıdır. Trimetoprim- sulfometoksazol (SXT), kinolonlar ve ampisilin tedavide tercih edilen ilaçlardır. Bunlardan özellikle çocuk yaş grubunda SXT ve ampisilin önemlidir. Bununla birlikte, dünyanın çeşitli bölgelerinden gelen raporlara göre *E. coli* ve *Shigella* enfeksiyonlarında SXT ve AMP direnci gittikçe artmaktadır (Vahaboğlu ve ark. 1993). Bu nedenle ampisilin tedavisi tercih edilmemeye başlamıştır. Ampisilin bir beta-laktam antibiyotiktir ve bu ilaca karşı en sık direnç beta-laktamazlarla olur. Son yıllarda beta-laktamazlar çeşitli bakteri cinsleri arasında yayılmaktadır (Bush et al. 1995).

Bu çalışmanın amacı, Kocaeli ilinde 1999 yılında izole edilen *Shigella* türü bakterilerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin araştırılması, hangi beta-laktamaz türlerini ürettikleri ve ampisiline gösterdikleri direncin genetik kökeninin saptanmasıdır.

Enterobacteriaceae ailesinin sınıflandırılmasında bugüne kadar kabuk gözetim biyokimyasal ve immünojenik özelliklere dayalı pek çok sınıflandırma DNA homolojileri kullanarak doğru sınıflandırmaya yeni cinsler ve türler saptanmaktadır. 1972'de yaklaşık 17 cins ve 26 türden oluşmakta iken, 1995'de 28 cins, 115 tür ve 7 enterik gruptan oluşmaktadır (Eisenstein, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Çok yeni yapıları bu sınıflandırma tablo 1'de görülmektedir (Eisenstein, 1995). *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerin tipik ve ayırtıcı özellikleri şunlardır:

Tablo 1. İnsanda bulaşık etkeni *Enterobacteriaceae* ailesine ait kabuk ve cinsler

Kabuklar	Cinsler
<i>Enterobacter</i>	<i>Edwardsiella, Shigella</i>
<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia, Yersinia, Proteus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia, Yersinia, Yersinia, Yersinia, Yersinia, Yersinia</i>

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterobacteriaceae:

Enterobacteriaceae ailesini oluşturan geniş, heterojen gram negatif bakteri grubu tıbbi açıdan en önemli mikroorganizmalar arasındadır.

Ailedeki birkaç cins önemli insan intestinal patojenleridir (ör: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.). Birkaçı normal insan gastrointestinal sisteminde kolonize olurlar (ör: *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.).

Barsaklarda kolonizasyon eğilimlerinden dolayı bir grup bakteri «enterik bakteriler» olarak adlandırılır. «Enterik bakteriler» deyişi gastrointestinal sistemde sık olarak bulunan bütün gram negatif basilleri içerir. *Pseudomonaceae* ve *Vibrionaceae* ailelerinden bazı türler de bu gruba girer. *Enterobacteriaceae* ailesi ve enterik bakteriler deyişi kısmen ortak bir grubu içermekle birlikte tamamen aynı mikroorganizmaları içermez, eş anlamlı kabul edilmemelidirler (Horan et al. 1986; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998). Prokaryotik kromozomun haploid tabiatı, Linnaean taksonomisinin primitif organizmalarda kullanılmasını zorlaştırmıştır. Tür, cins gibi özel tanımlar gerekmiştir (Eisenstein, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Enterobacteriaceae ailesinin sınıflandırmasında bugüne kadar kabul görmüş biyokimyasal ve immunolojik özelliklere dayalı pek çok sınıflandırma, DNA homolojileri incelenerek doğrulanmakta, yeni cinsler ve türler saptanmaktadır. 1972'de aile 11 cins ve 26 türden oluşmakta iken, 1995'de 28 cins, 115 tür ve 7 enterik gruptan oluşmaktadır (Eisenstein, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Çok yeni yapılan bir sınıflandırma tablo 1' de görülmektedir (Eisenstein, 1995). *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerin tipik ve ayırıcı özellikleri şunlardır: Yaklaşık

Tablo 1. İnsanda hastalık etkeni *Enterobacteriaceae* ailesine ait kabile ve cinsler

Kabileler	Cinsler
<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia, Shigella</i>
<i>Edwardsiellaeae</i>	<i>Edwardsiella</i>
<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Citrobactereae</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia</i>
<i>Protease</i>	<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>
<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Erwinieae</i>	<i>Erwinia</i>
Diğerleri	<i>Buttiauxella, Cedecea, Ewingella, Kluyvera, Tatumella, Rahnella</i>

0.3-0.5 µm en ve 1-6 µm boyunda, düz, gram negatif çomak biçiminde bakterilerdir, sporsuz, aerobdurlar, ancak anaerob koşullarda da üreyebilirler, yani fakültatif anaerobdurlar. *Erwinia* ve *Yersinia* cinslerindeki bazı kökenler dışında tümü nitratları nitritlere indirgerler. Alginatı eritemezler. Glukozu fermente ederken asit ve gaz oluşur. *Shigella dysenteriae* O grup 1 ve *Xenorhabdus nematophylus* dışındaki *Enterobacteriaceae* bakterilerinin tümü katalaz pozitiflerdir. NaCl ile üremeleri artmaz. Çoğu peritriş flajelleri ile hareketli, bazıları hareketsizdir. Tek istisna *Tatumella* cinsidir, 25 °C'de polar, subpolar, lateral flajellaları vardır ve 36°C'de hareketsizdirler . DNA içeriği % 39-59 oranında guanin+sitozinden oluşur (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

2.2. Epidemiyoloji

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri toprak ve bitkilerde yaygın olarak bulunur. İnsan ve hayvanların barsaklarında kolonizasyon yaparlar. İnsan gastro-intestinal sistem florasının %99' undan fazlasını çoğunluğu, *Bacteroides* cinsinden olan anaeroblarla birlikte bu bakteriler oluşturur.

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri normalde gastrointestinal sistem dışında bulunmazlar ama özellikle genitoüriner sistemde önemli enfeksiyonlara neden olurlar. Normal anatomik bariyerlere rağmen kolonizasyon gelişen kişilerde sıklıkla kolonizan bakteriler ile enfeksiyon gelişir. Pnömoni, septisemi, menenjit, apse oluşumu görülebilir (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Hospitalize hastalar değişik stresler nedeni ile *Enterobacteriaceae* üyeleri ile kolonizasyona ve enfeksiyona özellikle yatkındırlar. Sonuç olarak bu bakteriler nozokomiyal enfeksiyonların önemli nedenleri arasındadırlar. Klinik laboratuvarlarında izole edilen gram negatif bakterilerin yaklaşık %80'ini, klinik önemi olan izolatların yaklaşık %50'sini oluştururlar. Septisemi izolatlarının üçte birinden, bakteriyel gastroenteritlerin üçte ikisinden, üriner sistem enfeksiyonlarının dörtte üçünden *Enterobacteriaceae* üyelerinin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında son on yılda gram negatif bakteriler stabil bir gidiş gösterirken, gram pozitif bakteriler ve mantarlar belirgin artış göstermiştir. Nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* suşları arasında daha dirençli türlere doğru rahatsız edici bir yönelme saptanmaktadır. Daha az *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, daha fazla *Enterobacter* türleri izole edilmektedir (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

Hastane içi salgınlarda önemli rolleri olduğu için farklı kültürlerden izole edilen suşların aynı olup olmadığının saptanması çoğu kez gereklidir. Böyle saptamalar yayılım tarzını ve yayılımın kaynağının saptanmasını sağlar böylece kontrol için etkili tedbirler alınabilir.

Bakteriyel yayılım, bakterinin üremesini, DNA replikasyonunu ve aseksüel bölünmeyi gerektirir. Yeni bir plasmidin kazanılması gibi genetik yapıda major değişikliklerin olmadığı koşullarda üreyen bakteriler genetik ve fenotipik olarak atalarının özdeşidir. Ata ve ondan üreyen bakteriler aynı klonun üyeleridir. Antijenik yapı ve fizyoloji gibi fenotipik özelliklerin değerlendirilmesi, klonal yayılımın belirlenmesinde ve sanıldığından daha az sayıda klondan kaynaklandığının saptanmasında oldukça yararlıdır. Fenotipik tiplendirmeye alternatif olarak araştırmacılar son zamanlarda genetik analizleri kullanmaktadır. İzolatların parmak izlerinin (fingerprint) saptanmasında en basit metodlardan biri plazmid analizidir. Plazmid analizi, plazmid profilinde değişikliklere neden olabilecek minimal çevresel seçici baskı olduğu sürece yararlıdır. Plazmid seviyesindeki genetik esneklik nedeni ile araştırmacılar bakterilerin tanınmasında en stabil sonuçların elde edilebileceği kromozomal analizleri kullanmaktadır. Bu konuda «restriction fragment length polymorphism» (RFLP) ve «multilocus enzyme electrophoresis» en değerli metodlardır (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

2.3. Yapısı

Enterobacteriaceae üyeleri sitoplazmik membranı çevreleyen sert bir hücre zarfına sahiptirler. Ökaryotlardan farklı olarak nukleus yoktur, sitoplazmada yerleşmiş çift sarmal DNA içeren tek bir kromozomları vardır. Ribozomları, ökaryot ribozomlarından daha küçük ve basittir. Oksidatif metabolizma için mitokondri, protein yapımı için endoplazmik retikulum yoktur (Eisenstein, 1995).

Hücre zarfı multilamellar yapısı ile karakterizedir. İç kısımdaki sitoplazmik membran, araya serpilmiş proteinler içeren fosfolipid çift tabakadan oluşmaktadır. Sitoplazmik membranın dışında, gram pozitif bakterilere göre daha ince peptidoglikan tabaka vardır. Peptidoglikan organizmaya şeklini veren yoğun çapraz bağlı polimerlerden oluşur. Sitoplazmik membran ile dış membran tabaka arasındaki mesafeye periplazmik aralık adı verilir. Daha dıştaki kompleks membran diğer bir fosfolipid çift tabakayı içerir, lipidler, proteinler ve peptidoglikan tabakası ile işbirliği içinde olan polisakaritler içerirler. Dış membrandaki küçük bir lipoprotein peptidoglikanı oluşturan diamino pimelik asidin birkaç C-terminali ile bağlantılıdır. Dış membran, yapısındaki hidrofilik, çoğunlukla negatif yüklü karbonhidrat zincirleri ve asidik proteinler ile fagositozu

önleyen koruyucu özellikler sergiler. Dış membran içinde lipoproteinler (peptidoglikana bağlı), multimerik porin proteinleri (membran boyunca uzanan porlar transportu kolaylaştırır) ve diğer dış membran proteinleri bulunur. En dışta lipid A ve O spesifik polisakkarid antijenden oluşan lipopolisakkarid tabaka yer alır. Bu proteinler arasında kompleks, dışarı uzanan organeller bulunur. Flagella hareketi sağlar, iç membrandaki bazal yapıdan çıkar. Fimbria (veya adi piluslar) adhesinler kadar önemlidir. Seks pilusları, konjugatif plasmidleri olan bakterilerde bulunur ve plasmid DNA'sının konjugatif transferine aracılık eder (Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg and D'Amato, 1998).

2.4. Bakteri Yüzeyinin Antijenik Yapısı

Bakteri türlerinin antijenik profillerine göre sınıflandırılmasına dayanan ilk ve en iyi şema *Salmonella* serotiplerinin anti-salmonella serumları ile sınıflandırılmasıdır. Serotiplendirme *E. coli* için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Eisenstein, 1995).

Antiserumlar ile reaksiyona giren majör antijenik gruplar bütün *Enterobacteriaceae* türlerinde korunmuştur. Üç majör antijen sınıfı şunlardır: 1. O antijenleri veya somatik antijenler, 2. H veya flagellar antijenler, 3. K veya kapsüler antijenler.

Bazı *Salmonella* serotiplerinde bulunan Vi antijeni kapsüler antijenlerin subtipidir.

O antijeni bütün gram negatif bakterilerde bulunan zarf lipopolisakkaritinin polisakkarit yan zincirinden oluşur. *Enterobacteriaceae* türlerinin virulan suşları tipik olarak „smooth“ lipopolisakkarit içerir. Lipopolisakkaritin bu formu öz bölgesini içerir, lipid A ile bağlantılıdır. Mutant suşlar O antijenini kaybedebilirler, bu suşlar agar üzerinde R görünen koloniler oluşturur. Gram negatif bakteriler en azından öz lipopolisakkarit olmaksızın yaşamlarını sürdüremezler. O antijeni kesinlikle ısıya dayanıklıdır. Tip spesifik antiserumlar ile aglütinasyon O antijenlerinin gösterilmesinde kullanılan klasik reaksiyondur, çapraz reaksiyon görülebilir. Pekçok *E. coli* O sero grubu *Shigella* üyeleri ile çapraz reaksiyon gösterir. *Enterobacteriaceae* türleri dışında da kros reaksiyon görülebilir. Örneğin bazı *E. coli* O antijenleri *Vibrio* ile, insan kan grupları ile, memeli dokusundaki diğer hücre yüzey antijenleri ile çapraz reaksiyon verirler. O sero gruplarının farklı bakteri klonlarını temsil ettiği düşünülmektedir. Bu ilişki en iyi *E. coli* 'de gösterilmiştir. Sero gruplar, aynı zamanda pek çok biyokimyasal özelliği de paylaşırlar. Epidemiyolojik çalışmalar, belirli O serotipleri ve klinik enfeksiyonlar arasında çarpıcı ilişkiler göstermektedir. Henüz tam kanıtlanmış olmasa da, O sero grupları belirli enfeksiyonların gelişmesi için gerekli spesifik virulans özelliklerinin bir göstergesi olarak görev almaktadır (Koneman et al, 1992; Eisenstein, 1995; Bilgehan, 1995; Isenberg

and D'Amato, 1998).

H antijeni gram negatif bakterilere hareket yeteneği kazandıran bakteriyel flajellanın üzerinde bulunur. H antijeni ısıya duyarlıdır, protein yapısındadır. Flajellalı organizmalarda H antijeni, O antijeninden daha dominanttır. O antijeninin reaktivitesini saptayabilmek için önce H antijeninin ısı, asit veya alkol ile denatürasyonu gereklidir. Spesifik anti-H antikorları flajellalı bakterileri hareketsiz kılarlar. Bu immünolojik reaksiyon özellikle gastrointestinal ve üriner sistemdeki hareketli bakterilerin virulansının zayıflatılmasında önemlidir ve *Salmonella* 'larda flajellar faz değişikliği oluşmasından sorumludur. Faz değişikliği, bir bakterinin hareketini sınırlayan ilk tip flajella antikorlarından korunmak için farklı yapıda flajella antijeni yapabilme yeteneğidir. Flajellar faz değişikliği bir DNA parçası ve bir repressör genin kontrolü altındadır. Benzer şekilde *E. coli* suşları tip 1 fimbria sentezlerler.

Son majör antijen sınıfı K veya kapsüller antijendir. K antijeni ısıdan etkilenir. Kapsül antijeni varsa O reaksiyonu engellenebilir. K antijeninin iki önemli örneği *Salmonella typhi* 'nin virulansında önemli Vi antijeni, *E. coli* 'nin K1 antijendir.

2.5. Kapsül

Kapsül savunma görevi yapar. Antikorların bakteriye bağlanmasını ve lökositlerin bakterileri fagosite etmesini azaltarak bakteriyel virülansı destekler. Kapsülün savunma görevi iki özelliği ile gerçekleşmektedir: Polisakkarit yapısı kapsülü oldukça hidrofik kılar, bu durum hidrofobik yüzeyli konak hücrelerinin fagositozunu kuvvetle inhibe eder. Pekçok kapsül oldukça zayıf immunojenlerdir, komplemanı zayıf aktive ederler.

E. coli 'de en iyi çalışılmış kapsül K1 kapsüller antijendir. N asetil nöraminik asidin bir polimeridir. Memeli dokusundaki benzer yapılara çok benzediği için immunojenitesi zayıftır. K1 pozitif ve K1 negatif izojenik *E. coli* türleri ile yapılan çalışmalar sadece K1 negatif mutantların kompleman ile öldürülebildiğini göstermiştir. Böylece K1 kapsülü açıkça koruyucu özellikte bir virülans faktörüdür.

Her ne kadar kapsül gram negatif bakterilerin kanda çoğalmalarına izin veren en önemli komponent ise de, bakteri zarfının diğer komponentleri de serumun bakterisid etkisine karşı gösterilen direnç katkıda bulunurlar. Colicin V plasmidi içeren bazı *E. coli* türlerinde özel bir genetik determinantın (iss) serumun ve komplemanın bakterisid etkisine direnci kodladığı gösterilmiştir. Diğer plasmidler, örneğin bazı R plasmidleri, *E. coli* 'nin serumun bakterisid aktivitesine direncini arttırlar.

2.6. Shigella

Shigella cinsi antijenik yapılarına ve fermantasyon özelliklerine göre; grup A (*Shigella dysenteriae*), grup B (*Shigella flexneri*), grup C (*Shigella boydii*) ve grup D (*Shigella sonnei*) olmak üzere dört türe ayrılmaktadır. *Shigella* cinsinin 40'ın üstündeki serotipleri bu dört grupta yer alır (Keusch, 1992; Butler, 1992). *Shigella* cinsindeki bakteriler *Enterobacteriaceae* ailesinden, *Escherichiae* takımına ait, *E.coli* ile benzerliği olan, gram negatif, hareketsiz basillerdir. Laktozu fermente etmezler, ama *S. sonnei* laktozu geç fermente edebilir.

Bu bakterilerin önemli özellikleri:

- 1) Hareketsiz
- 2) Kapsülsüz
- 3) Adonitol negatif
- 4) DNase negatif
- 5) Hydrogen sulfur (Triple Sugar Iron agarda) negatif
- 6) Inozitol negatif,
- 7) Potasyum siyanür negatif
- 8). Malonat negatif
- 9) Mannitol pozitif (*S. dysenteriae* hariç)
- 10) Metil kırmızısı pozitif
- 11) Fenilalenin deaminaz negatif
- 12) Ureaz negatif
- 13) Voges-Proskauer negatif
- 14) Sitrat negatif
- 15) Glukozdan gaz oluşturma negatif
- 16) Laktoz fermantasyonu negatif

Shigella cinsinin bazı özellikleri virulansda önemli rol oynamaktadır. Bu özelliklerden en önemlisi bu bakterilerin invazyon yetenekleridir. Memeli hücresine penetre olma ve hücre içinde yaşama, çoğalma özelliğine sahiptirler. İnvazyon özellikleri *Serény testi* ile ve HeLa hücrelerine invazyonlarının gösterilmesi ile saptanır. Serény testinde bakteri kültür süspansiyonu kobayın konjunktiva kesesine inoküle edilir, 24-48 saat sonra keratokonjunktivit oluşumu invazyon özelliğinin varlığını gösterir. *Shigella* türlerinin invazyon ve hücre içinde yaşayabilme özelliklerinin hem bakteri kromozomunda bulunan genlerin, hem de 140 MDa büyüklüğündeki plazmidlerde bulunan bazı genlerin genetik kontrolünde olduğu gösterilmiştir (Hale, 1991; Dupont, 1995).

Shigella cinsinin virulansında rol oynayan ikinci önemli faktör ise bakterinin

salgıladığı ekzotoksindir. *S. dysenteriae* Tip 1'in (Shiga basilinini) salgıladığı toksin (Shiga toksini) fare ve tavşanlarda paraliziler oluşturan bir nörotoksindir. *S. dysenteriae* 1'in oluşturduğu enfeksiyonların ağır seyretmesi bu toksinin etkisine bağlanmaktadır. Ayrıca bu toksinin tavşan ince barsağında histolojik değişiklik yapmadan izotonik sıvı sekresyonuna yol açtığı, ayrıca epitel hücrelerinde harabiyet yaparak belirgin bir inflamasyona neden olduğu, yani sitotoksin özellikte olduğu gösterilmiştir. Shiga toksinine benzeyen toksin salınımının *S. flexneri* ve *S. sonnei* suşlarında da daha az olmak kaydıyla bulunduğu gösterilmiştir (Keusch and Bennish,1991; Tesh and O'Brien, 1991; Dupont, 1995).

Bu virulans özellikleri *Shigella* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemlidir. *Shigella* cinsi bakteriler diğer enterik patojenlere (*V. cholerae*, *Salmonella* vb) göre çok daha az sayılarda enfektiftirler. İkiyüz tane *Shigella* bakterisi dahi sağlıklı kişilerde hastalık oluşturabilmektedir. Düşük dozda enfektif olma özelliği, *Shigella* 'ların kişiden kişiye kolayca bulaşmasına, aile içi sekonder olguların fazla görülmesine yol açar.

Hasta ya da taşıyıcıların elleriyle enfeksiyonu bulaştırma sıklığı, *Shigella* 'larda (inokulum dozu 10^2) diğer enterik patojenlere göre daha fazladır. Bu nedenle temiz içme suyu, sağlıklı atık giderim sistemlerine sahip olan gelişmiş ülkelerde bile şigeloz hala varlığını sürdüren bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde *Shigella* enfeksiyonları daha çok doğrudan kişisel temasla bulaşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise kontamine su ve gıdalarla bulaşma daha fazladır. Gelişmiş ülkelerde düşkünlerin, zeka özürlülerin vb. yaşadığı bakımevi ve yurtlarda şigeloz görülme sıklığı normal nüfusa göre çok daha yüksektir. Gelişmekte olan ülkelerde ise insan dışkımasının herhangi bir şekilde gıda ve sulara bulaşma olasılığının varlığı, atık giderim sistemlerinin, temiz su teminine yönelik alt yapının yetersizliği, kalabalık yaşama koşulları, kişisel hijyene önem verilmemesi şigeloz riskini arttıran faktörlerdir. *Shigella* 'lar oda ısısındaki su içinde 6 ay kadar canlı kalabilirler, bu nedenle su depoları rezervuar olabilmektedir (Keusch and Bennish,1991; Butler, 1992).

Basilli dizanteri genel olarak bir yaz mevsimi hastalığıdır, yaz aylarında yılın diğer aylarına göre daha fazla görülür. Böyle olmasında sineklerin mekanik taşıyıcı olarak rol oynamasının da katkısı olduğu düşünölmektedir.

Şigeloz en çok 6 ay-10 yaş arasındaki çocuklarda görölmektedir. Erişkin yaş grubunda kadınlarda erkeklere göre daha fazla görölmektedir, bunun nedeni büyük olasılıkla kadınların çocuklarla olan ilişkisinin erkeklere oranla daha fazla olmasıdır (Keusch and Bennish,1991; Keusch, 1992; Butler, 1992)

2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde 8 ayrı direnç mekanizması tanımlanmaktadır:

1. Enzimatik inhibisyon (beta-laktamazlar, aminoglikozit modifiye eden enzimler, kloramfenikol asetiltransferaz ve eritromisin esteraz)
2. Membran geçirgenliğinin azalması:
3. Antibiyotığın hücre dışına aktif pompalanması (efflux)
4. Ribosomal hedefte oluşan değişiklikler
5. Hücre duvarı prekürsörlerinin hedeflerinin değişmesi (Glikopeptidlere direnç)
6. Hedef enzimlerde değişiklikler
7. Hedef enzimlerin aşırı yapımı ve
8. İnhibe edilmiş basamakların "by pass" ile geçilmesidir (Sülfonamid direnci) (Mayer et al. 1995).

2.8. Antibiyotik Direncinin Moleküler Genetiği

Genetik değişkenlik (variability) mikrobiyal evolüsyonun temelidir. Antimikrobiyal ajanlar, bakteri popülasyonu üzerine, dirençli olanların yaşamlarını sürdürebildiği güçlü seçici baskı uygularlar. Genetik değişkenlik birkaç mekanizma ile oluşur. Nükleotid baz çiftinde oluşabilecek nokta mutasyonları "mikroevolüsyoner değişiklik" olarak tanımlanır. Bu mutasyonlar antimikrobiyal ajanın hedef bölgesini değiştirebilir, böylece antibiyotik aktivitesi etkilenir. Bakteride ikinci düzeyde genomik değişkenlik "makroevolüsyoner değişiklik" olarak adlandırılır, büyük DNA segmentlerinin tek bir seferde büyük çaplı değişime uğraması ile meydana gelir. Böyle düzenlemeler, inversiyon, duplikasyon, insersiyon, delesyon ve büyük bir DNA dizisinin bakteriyel kromozomun bir bölgesinden diğer bir bölgeye transpozisyonunu içerir. Bakteri kromozomunun büyük segmentlerinin geniş çaplı düzenlemeleri transpozonlar veya insersiyon dizileri gibi bazı özel genetik elemanlar ile sıklıkla oluşmaktadır. Bu yapılar bakteriyel kromozomun geri kalan kısmından bağımsız hareket etme kapasitesine sahiptir. Bakteride üçüncü düzeyde genetik değişkenlik, plasmidler, bakteriyofajlar ve taşınabilir genetik elemanlar ile yabancı DNA'nın alınması ile oluşur. Bu ekstrakromozomal elemanların kalıtsal olarak aktarılması ile organizma antimikrobiyal ajanların seçici baskısı ile başa çıkma yeteneği kazanır. Bu mekanizmalar bakterilere herhangi bir antimikrobiyal ajana karşı sınırsız direnç kazandırır. Antibiyotik direnç geni birkez oluştuğundan sonra bu direnç determinantı diğer bakterilere transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon, transpozisyon ile yayılabilir. Dirençli bakteriler antibiyotik kullanan hastaların floralarında çoğalabilirler (Mayer et al. 1995).

2.9. Plazmidler

Türler arasında antibiyotik direncinin yayılmasında hızlı artış, spesifik direnç genlerinin yayılması ile ilişkilidir. Plazmidler de direnç genlerinin yayılması için uygun yapılardır. Plazmidler, dairesel çift sarmal DNA molekülünden oluşan ekstrakromozomal genetik elemanlardır. Büyüklükleri 10-400 kilobaz çifti arasında değişebilir. Plazmidler, bir fenotipik özelliği belirleyen herhangi bir başka gen gibi kendi replikasyon mekanizmalarını taşırlar. Özelleşmiş çok önemli bir plazmid sınıfı R plazmidlerdir, gram negatif bakteriler arasında antimikrobiyal direncin yayılmasında önemli rolleri vardır. R plazmidleri üzerinde bulunan, ilaç direncini belirleyen bölgelerin herbiri transpozon adı verilen genetik bir paket şeklinde diğer plazmidlere ve hatta kromozoma taşınabilirler. Her ne kadar transpozisyon oldukça nadir ise de, çok sayıda transpozon içeren plazmidlerin seçilmesi, plazmid içeren bakterinin çok sayıda antimikrobiyal ajanın seçici baskısına maruz kalması durumunda mümkündür. Tıpta ve tarımda antimikrobiyal ajanların aşırı kullanımı sonunda pekçok R plazmidi, çok sayıda transpozon içermektedir ve böylece taşındığı bakteriye çoklu ilaç direnci fenotipini aktarmaktadır. Pekçok plazmidde olduğu gibi, R plazmidlerinin çoğu diğer cins ve türlere konjugal transfer mekanizmasına sahiptir, böylece ilaç direnci daha fazla yayılmaktadır (Mayer et al. 1995).

Bazı konjugasyon yeteneği fazla plazmidler örneğin RK2 sınıfı, cinsler arası karşılıklı R plazmidlerin transferini oldukça yüksek sıklıkta gerçekleştirebilmektedir. Bireysel virulans faktörlerinin pekçoğu (kolonizasyon faktörleri, enterotoksin, hemolizin gibi) plazmidle taşınırlar. Tahmin edilebileceği gibi bu virulans faktörleri aynı zamanda ilaç direncini belirleyen bölgeleri de içeren plazmidlerle taşınırlar. Böylece, antimikrobiyal kullanımı gibi çevre baskısı R plazmidlerin daha fazla yayılması yanında virulans faktörlerinin de yayılmasına neden olur. İlaç direncini belirleyen bölgeler olmasa da, bazı virulan bakteri suşlarında bulunan plazmidlerin çok sayıda virulans faktörünü taşıdığı bulunmuştur. Örneğin enterotoksijenik *E. coli* suşlarında bulunan plazmidlerin hem enterotoksin yapımı hem de insan gastrointestinal sisteminde kolonizasyonda önemli olan kolonizasyon faktörü antijeninin genini taşıdığı gösterilmiştir (Mayer et al. 1995).

Plazmidlerle antibiyotik direncinin yayılması birkaç yolla mümkündür. Spesifik bir mikroorganizmanın tek bir klonu, mutasyon veya direnç plazmidini kalıtım yolu ile alarak dirençli hale gelebilir. Sonuçta oluşan dirençli organizma özel bir bölgeye iyi uyum gösteren genlere sahip olarak kolayca yayılabilir özelliği gösterebilir. Tek bir klon antibiyotik direncinin multipl veya rekürren salgınlarından sorumlu olabilir. Konjugatif plazmidler bir türden diğerine taşınabilir, böylece daha önceden duyarlı olan türlerde antibiyotik direnci yeni salgınlara neden olabilir (Mayer et al. 1995).

2.10. Taşınabilir (Transposable) Genetik Elemanlar:

Transpozonlar, bakteriyel kromozomun bir bölgesini başka bir kromozoma, plazmid veya bakteriyofaj DNA'sına taşıyabilir. Taşınabilir genetik elemanlar, özelleşmiş bir rekombinasyon sistemi taşırlar, büyük homolog DNA dizilerinin rekombinasyonuna izin veren klasik rekombinasyon sisteminden (bakterinin rec A sistemi) bağımsızdır. Taşınabilir elemanların recA'dan bağımsız rekombinasyon sistemi nonhomolog DNA dizileri arasında raslantısal olarak gelişir. Tek bir seferde büyük DNA dizilerinin geniş çaplı modifikasyonu ile sonuçlanır (Mayer et al. 1995).

İki tip taşınabilir eleman vardır: 1. transpozonlar, 2. insersiyon dizileri.

Transpozonlar, antibiyotik direnci gibi kolay taşınabilir fenotipik özelliklere aracılık ettikleri için insersiyon dizilerinden ayrılırlar. Her eleman bağımsız bir birim gibi taşınabilir. Her iki yapı da iki uçta kısa özdeş (identical) ama ters DNA dizileri taşırlar (inverted repeats). Özdeş ama ters çevrilmiş DNA dizileri transpozisyon için gereklidir. Transpozonlar ve insersiyon dizileri, otonom olarak kendi replikasyonlarını yapamazlar, replike olmak ve bir bakteri popülasyonunda yaşamlarını sürdürmek için kromozom, bakteriyofaj veya plazmid gibi bir replikon üzerinde bulunmaları gerekir. Konjugatif transpozonlar, yeni tanımlanan bir sınıftır, bir bakteri kromozomundan diğerine bir plazmid veya bir bakteriyofaj yapısına girmeden hareket edebilirler. Özellikle aerobik ve anaerobik gram pozitif organizmalarda saptanmaktadır. Transpozisyon genellikle orijinal verici DNA dizisinde taşınabilir elemanın lokalize replikasyonuna ve taşınabilir elemanın bir kopyasının alıcı DNA dizisine girmesine neden olur (replikatif transpozisyon). Transpozisyon bakteri popülasyonunda sürekli devam eden bir işlemdir. Örnek olarak tetrasiklin direnci taşıyan transpozonun *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* arasında yayılmasıdır. Transpozonlar çok sayıda antibiyotik direnç determinantı içeren R plazmidlerinin oluşumunda da gereklidirler. Tek transpozon iki uçta taşıdığı özdeş ama ters çevrilmiş DNA dizileri (inverted repeat termini) ile multipl antibiyotik direncini kodlayabilir. Özdeş eritromisin direnç geni streptokok, kamfilobakter ve enterokoklarda saptanmıştır. Aminoglikozid ve beta laktam direncinin stafilokoklardan kaynaklandığı açıkça görülmektedir. Uygun çevresel seçici baskı altında multiresistan türlerin evolüsyonunun sürmesi kaçınılmazdır (Mayer et al. 1995).

2.11. DNA İntegrason Elemanları

Antibiyotik direncine aracılık eden yapısal genler çoğunlukla yakın ilişki içindedirler; bakteri kromozomu veya plazmidinde yan yana bulunabilirler. DNA dizilerinin genetik

araştırmaları, antibiyotik direnç genlerine komşu tek bir integrasyon biriminin genellikle promoter bölgelerin yanında bulunduğunu göstermiştir. Bu integrasyon birimlerine integron denir. Büyük nonhomolog DNA dizilerinin bölgeye spesifik rekombinasyonu için rekombinasyonel «hot spot» fonksiyonu görürler. İntegron, rec A'dan bağımsız rekombinasyonu kolaylaştırıcı integras fonksiyonu görür ve 59 baz çiftinden oluşan çok iyi korunmuş DNA dizisinden oluşan bir integrasyon bölgesi gen transferini sağlar. Her ne kadar integrasyon elementleri yapısal ve fonksiyonel olarak transpozonlardan ayrılırsalar da, bakteri popülasyonunda olduğuca yaygındır ve antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli rolleri vardır. Yabancı DNA kaynaklarından gelen direnç genlerinin alınması için uygun bölgeler oluştururlar. İntegronlar, direnç genleri için ekspresyon kasetleri işlevi de görürler, çünkü yeni alınan DNA dizisinin 5' ucuna olduğuca yakın etkili bir promoter bölgesi sağlarlar.

2.12. Enzimatik İnhibisyon, beta-Laktamazlar ve Sınıflandırılması

Beta-laktam antibiyotiklere direnç, başlıca beta-laktam halkasının amid bağını kırarak bu antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerinin yapımına bağlıdır. Pekçok beta-laktamaz vardır. Ya kromozomal genlerde ya da plazmid veya transpozonlar gibi transfer edilebilir genlerde kodlanmaktadır. *E. coli*'de penisilaz yapımını ilk kez 1940 yılında Abraham ve Chain göstermişlerdir. Sawai, 1968' de enzimleri penisilinaz ve sefalosporinaz olarak ayırmıştır. İlk sınıflandırma 1970' de Jack ve Richmond tarafından önerilmiştir. 1973' de Richmond ve Sykes, bilinen bütün gram negatif bakteri beta-laktamazlarını substrat profillerine göre 5 grupta toplamıştır. Matthew, özgül beta-laktamazları "isoelectric focusing" (IEF) ile tanımladıktan sonra Sykes ve Matthew bu şemayı tekrar düzenlemiştir.

1981' de Mitsuhashi ve Inoue „ sefuroksimi hidrolize eden beta-laktamazlar“ kategorisini eklemişlerdir. 1989' da Bush ilk kez beta-laktamazların, substrat ve inhibitör özelliklerini moleküler yapı ile ilişkilendirerek sınıflandırmıştır. Moleküler yapı ile ilgili sınıflandırma ise ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmıştır. Class C sefalosporinazlar 1981 yılında Jaurin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidroliz eden Class D enzimler ise 1980' lerin sonunda diğer serin enzimlerinden ayrılmıştır (Gür, 1996; 1997).

Amino asit ve nükleotid dizilerine dayanan çalışmalar sonucunda dört ayrı sınıf beta-laktamaz tanımlanmaktadır.

A sınıfı beta-laktamazlar 29 bin Dalton moleköl ağırlığındadır. Aktif bölgelerinde serin kalıntısı taşırlar, tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Örnek olarak gram negatif bakterilerde olduğuca yaygın olan TEM-1 beta-laktamazdır.

B sınıfı metalloenzimler beta-laktamaz aktivitesi için çinko bağlı thiol grubu taşırlar.

C sınıfı, *E. coli* K12' nin kromozomal amp C geni tarafından belirlenen beta-laktamazları içerir. *E. coli* K12' nin kromozomal amp C geni, *Shigella* ve *Klebsiella* türlerinin kromozomal beta-laktamazları ile ileri derecede DNA dizi homolojisi gösterir. Bu enzimler 39 bin Dalton molekül ağırlığında büyük proteinlerdir, başlıca sefalosporinaz aktivitesi gösterirler. Aktif bölgelerinde serin içerirler ama A sınıfı beta-laktamazlarla az homoloji gösterirler. Bu arada A ve C sınıfı beta-laktamazların tersier yapıları, PBP'e çarpıcı benzerlik gösterir. A ve C sınıfı enzimler, PBP'den gelişmiş olabilir.

D sınıfı beta-laktamazlar *E. coli*' deki oksasilin hidrolize eden enzimlerdir.

beta laktamazların en yeni sınıflaması 1995 yılında Bush-Jacoby-Medeiros tarafından yapılmıştır ve tablo 2' de görülmektedir (Bush et al. 1995; Gür, 1996; 1997).

Grup 1' de klavülonik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar bulunur. Kromozomal enzimlerdir, indüklenebilen veya dereprese beta-laktamazlardır. Moleküler grup olarak Sınıf C' dedirler. İzoelektrik noktaları 7' nin üzerindedir. Kromozomal AmpC enzimleri, plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, MOX-1, BIL-1 beta-laktamazları içerir.

Grup 2'de beta-laktamaz-inhibitörlerine duyarlı olan moleküler sınıf A veya D içinde yer alan enzimler bulunur.

Grup 2a, penisilini hidrolize eden, klavülonik asite duyarlı enzimleri içerir. *Staphylococcus aureus*' un enzimleri, *Bacillus cereus*' un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*' da tanımlanan enzimler bu gruptadır.

Grup 2b, hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden klavülonik asite duyarlı beta-laktamazları içerir. Plazmid kontrolündeki TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 bu gruptadır (Gür, 1996; 1997).

Grup 2b, geniş spektrumlu beta-laktamaları hidrolize edip klavülonik asit ile inhibe olan enzimlerdir. TEM-3, TEM-26, SHV-2, SHV-6, kromozomal K1 enzimleri ve ilk kez Türk izolatlarında saptanan PER-1 enzimi bu grupta yer alır. PER-1, *Acinetobacter* suşlarında dökümanite edilmiş ilk ESBL' dir (Vahaboglu et al. 1997; Vahaboğlu, 1998).

Grup 2br, klavülonik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazları içerir. TEM-30' dan TEM-36' a kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 bu gruptadır.

Grup 2c, karbenisilini hidrolize eden klavülonik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophila*' nın AER-1 enzimi, *Moraxella catarrhalis*' in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Vibrio cholerae*' nın SAR-1 enzimi bu gruptadır (Gür, 1996; 1997).

Grup 2d, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidrolize eden beta-laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. OXA-11 ve OXA-14 Türkiye' den

Tablo 2: Beta-laktamaz Grupları ve Genel Özellikleri (Bush-Jacoby-Medeiros)

β -laktamaz	Molekül sınıfı	Substrat	KA*, EDTA	Enzimlere örnekler
1	C	Sefalosporinler	- , -	Gram negatif bakterilerin Amp C enzimleri; MIR-1
2a	A	Penisilinler	+ , -	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	+ , -	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar	+ , -	TEM-3 ile TEM-26, SHV-2 ile SHV-6 , Klebsiella oxytoca K1
2br	A	Penisilinler	+ , -	TEM-30 ile TEM-36, TCR-1
2c	A	Penisilinler, Karbenisilin	+ , -	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, Kloksasilin	+ , -	OXA-1 ile OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Sefalosporinler	+ , -	Proteus vulgaris'in induklebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+ , -	Enterobacter cloacae'nin NMC-A' sı, Serratia marcescens'in Sme-1' i
3	B	Bir çok β -laktam, Karbapenemler	- , +	Stenotrophomonas maltophilia' nın L1'I, Bacteroides fragilis' in CerA' sı
4	Tanımlanmamış	Penisilinler	- , ?	Pseudomonas cepacia' nin penisilinazı

* KA: Klavülonik asit

bildirilmiştir (Hall et al. 1993; Danel et al. 1995; Gür, 1996; 1997).

Grup 2e, klavülonik asit ile inhibe olan sefalosporinazları içerir (Gür, 1996; 1997).

Grup 2f, *Enterobacter cloacae*' nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *Enterobacter cloacae*' nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens*' in Sme-1 enzimini içerir. Karbapenemleri hidrolize etmekte, klavülonik asit ile inhibe olmaktadır (Gür, 1996; 1997).

Grup 3, klavülonik asit ile inhibe olmayan metalloenzimlerdir. EDTA ile inhibe olurlar. Aktiviteleri için Zn iyonuna ihtiyaçları vardır (Gür, 1996; 1997).

Grup 4, klavülonik asit ile inhibe olmayan penisilinazları içerir (Gür, 1996; 1997).

1998 yılında Nordmann yeni saptanan beta-laktamazları sınıflandırmıştır.

TEM ve SHV grubundan olmayan ESBL' leri, plazmid aracılı sefalosporinazları, TEM grubundan türemiş 15 adet inhibitöre dirençli penisilinazı ve yeni saptanan karbapenemazları sınıflandırmıştır (Tablo 3) (Nordman, 1998). TEM ve SHV grubundan olmayan yeni ESBL' ler:

1. MEN-1, 1992 yılında Fransa' da *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında bildirilmiştir. TEM türevleri ile % 38 homoloji gösterir. Daha sonra Arjantin' den de (CTX-M1) bildirilmiştir. 1992 yılında Almanya' dan CTX-M2 bildirilmiştir., MEN-1 ile % 84 amino asit homolojisi gösterir.

2. PER-1 ilk kez Fransa' da Türkiye' den giden bir hastada saptanan bir *Pseudomonas aeruginosa* izolatında saptanmıştır. Daha sonra ise Türk *Salmonella typhimurium* kökenlerinde ve diğer *Enterobacteriaceae* kökenlerinde bildirilmiştir. TEM türevi beta-laktamazlar ile % 35 homoloji gösterirler. TEM ve SHV kökenlerinde daha önce görüldüğü gibi PER-1 de *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* cinsleri arasında genetik değiş tokuş olduğunu göstermektedir. PER-1, *Acinetobacter* suşlarında dökümanite edilmiş ilk ESBL' dir (Vahaboglu et al, 1997).

PER-2 daha sonra Almanya' da *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. Mirabilis*, *S. typhimurium* izolatlarında bildirilmiştir. PER-1 ile % 86 homoloji gösterir.

VEB-1 son dönemde Fransa' da Vietnamlı bir hastadan bildirilmiştir. PER-1 ile % 40 homoloji gösterir.

TOHO-1 1994 yılında Japonya' dan bildirilmiştir, TEM türevleri ile % 60 homoloji gösterirler.

Son dönemde plazmid aracılı sefalosporinazlar ortaya çıkmıştır. Bu enzimler sınıf C sefalosporinazlardır. Kromozomda bulunan AmpC sefalosporinazlarla ilişkilidirler. Sefoksitin, oksiminosefalosporinler ve aztreonama dirence neden olurlar, klavülonik asit veya tazobaktamla inhibe olmazlar.

Diğer bir yeni grup, inhibitörlere dirençli TEM beta-laktamazlardır. Son olarak 14 tanedirler (TEM-30' dan TEM-41'e, TEM-44, TEM-45). İlk olarak Fransa ve İspanya'

Tablo 3: Beta-laktamazların Sınıflaması ve Özellikleri

Ambler genetik sınıflaması	Enzimlerin Tipleri	Hidroliz Ettiği Antibiyotikler ve Önemli Özellikleri	Organizmalar	Yerleşimi
A	Dar spektrumlu β -laktamazlar: TEM-1, TEM-2, SHV-1	Aminopenisilinler, karboksipenisilinler, KA* ' e duyarlı	Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa(+)	Plazmid ve kromozom
A	Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar: TEM-3' den TEM-29' a, TEM-42, TEM-43, TEM-51, SHV-2' DEN SHV-9' a, PER-1, PER-2, CTX-M1, CTX-M2, MEN-1, VEB-1, TOHO-1	Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, KA' e duyarlı	Enterobacteriaceae, (<i>K. pneumoniae</i> ++ [†]) P. aeruginosa(+) [‡] Enterobacteriaceae, P. aeruginosa (+)	Plazmid Plazmid
A	İnhibitöre dirençli β -laktamazlar: TEM-30' dan TEM-41' e, TEM-44, TEM-45	Aminopenisilinler, karboksipenisilinler, KA' e dirençli	Enterobacteriaceae, (<i>E. coli</i> ++)	Plazmid
A	İnhibitöre dirençli ve genişletilmiş spektrumlu β -laktamazlar: SHV-10, isimlendirilememiş TEM cinsi enzimler	Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (düşük düzeyde), KA' e dirençli	<i>E. coli</i>	Plazmid
A	Karbapenemazlar: Nmc A, Sme-1, IMI-1	Karbapenemler, aztreonam, KA' e duyarlı	<i>E. cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> ,	Kromozomal
B	Karbapenemaz: IMP-1	Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, karbapenemler, KA' e dirençli	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa	Plazmid ve kromozom
C	Plazmid aracılı sefalosporinazlar: MIR-1, MOX-1, CMY-1, CMY-2, LAT-1, BIL-1, FOX-1, ACT-1	Sefamisinler, oksiminosefalosporinler, aztreonam, KA' e dirençli (MOX-1 dışında)	Enterobacteriaceae, (<i>K. pneumoniae</i> ++)	Plazmid

KA: Klavülonik asit

† ++: sık

‡ +: nadir

da *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. mirabilis* suşlarında bildirilmişlerdir.

Son sekiz yıl içinde yeni karbapenemazların sayısı giderek artmıştır. Sınıf A penisilinazlar veya sınıf B metalloenzimler arasında yerlerini alırlar.

2.13. Gram Pozitif Bakteriler

Gram pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz yapan major patojen stafilokoklardır. Stafilokokal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğunluğu indüklenebilir ve ekstraselüler ekskrete edilir. Stafilokokal beta-laktamazları belirleyen genler genellikle küçük plazmidlerin veya transpozonların üzerinde taşınır. beta-laktamazları ve diğer antimikrobiallere direnci kodlayan daha büyük plazmidler olabilir ve konjugasyon ile transfer edilebilir. Sadece *Staphylococcus aureus* türleri arasında değil, *Staphylococcus aureus* ile *Staphylococcus epidermidis* arasında da transfer olabilir.

Enterokoklar, stafilokoklardan orijin aldığı düşünülen ve plazmidlerle taşınan bir beta-laktamaz üretirler. 1981' de Teksas' ta ilk suşun saptanmasından bu yana, beta-laktamaz yapan enterokoklar bütün ABD ve Güney Amerika'da saptanmıştır. beta-laktamaz geni sık olarak yüksek düzeyde gentamisin direncini kodlayan genle birlikte bulunur. Plazmidler veya transpozonlarla taşınabilirler. İlginç olan, bu transpozonlar, stafilokokal beta-laktamaz transpozonlarına benzer yapıdadır ve onlardan türemiş olabilir (Mayer et al. 1995).

2.14. Gram Negatif Bakteriler

Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilerden daha çok çeşit beta-laktamaz üretirler. beta-laktamazlar konusunda son sınıflama Bush tarafından yapılmıştır. beta-laktamazları substrat profillerine ve klavülonik asit ile inhibe olup olmamasına göre sınıflandırmıştır. 6 sınıfta gruplanabilir:

1. Geniş spektrumlu enzimler (Broad spectrum enzymes): Benzilpenisilin ve sefaloridini aynı oranda hidrolize ederler.
2. Oksasilinazlar: Oksasilin ve ilgili enzimleri hızla hidrolize ederler.
3. Karbenisilinazlar: Karbenisilini yıkarlar.
4. Genişlemiş Spektumlu beta-laktamazlar (Extended spectrum? beta-laktamases, ESBL): Oksimino beta-laktamları (sefotaksim, seftazidim, aztreonam gibi) inaktive eden enzimlerdir. Nokta mutasyonlar ve rekombinasyon yaygın bulunan TEM'in 24, SHV'nin 4 varyantının oluşmasına neden olmuştur.
5. Sefaloşporinazlar: Oksimino beta-laktamları parçalayan ve klavülonata dirençli enzimlerdir. Bu enzimleri kodlayan genlerin nükleotid dizileri, *Enterobacter*,

Citrobacter, *Klebsiella oxytoca*' nin kromozomal beta-laktamaz genleri ile benzerdir ve benzer biyokimyasal özelliklere sahiptirler.

6. Karbapenemazlar: *Pseudomonas aeruginosa*' da bulunan nadir bir beta-laktamazdır, imipenemi hidrolize eder (Mayer et al. 1995).

2.15. Anaerobik Bakteriler

Anaerobik bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere dirençleri beta-laktamaz yapımı ile ilgilidir. Fuzobakterilerin ve *Clostridium*'ların beta-laktamazları başlıca penisilinazdır. *Bacteroides fragilis* tarafından üretilenler ise çoğunlukla sefalosporinazlardır, bazıları sefoksitin ve imipenemi hidrolize ederler ve transfer edilebilirler. Sefalosporinazların çoğu klavülonat, sulbaktam veya tazobactam ile inhibe olur. Karbapenemazlar, EDTA ile inhibe olan metalloenzimlerdir ama klavülonat veya sulbaktamla inhibe olmazlar (Mayer et al. 1995).

2.16. Klinik İzolatların Dağılımı

Plazmidler ve transpozonlar üzerinde beta-laktamaz genlerinin varlığı, başlangıçta bir bakteri grubuna sınırlı beta-laktamazların daha sonra diğer gruplarda da görülmesini sağlar. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı, lokal olarak prevalansı artan dirençli organizmaların seçilmesini teşvik eder. Dirençli suşlar daha sonra bütün dünyaya yayılır. Bu olayın başlıca örneği TEM-1 beta-laktamaz ile oluşmuştur, *Enterobacteriaceae*' den *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*' ye yayılmıştır (Mayer et al. 1995).

Klinik izolatlar iki hatta üç plazmidle belirlenen beta-laktamaz yapabilir. Bütün vakalarda TEM-1 üretilen beta-laktamazlardan biridir. Güney Amerika ve Uzak Doğu dan pek çok tür yeni ve/veya multipl beta-laktamaza sahiptir. Eczacılık endüstrisinin, beta-laktamazların hidrolizine dayanıklı yeni beta-laktamlar geliştirmekteki başarısı, üçüncü kuşak beta-laktam antibiyotiklerin (1978' de Avrupa' da, 1981'de ABD' de) klinik kullanıma girmesini sağlamıştır. Bu antibiyotikler, bilinen plazmidlerle aktarılan beta-laktamazların hidrolizine çok dirençlidir. Daha sonra 1983'de Almanya'da *K. pneumoniae* izolatlarında ve daha sonra diğer *Enterobacteriaceae* suşlarında sefotaksim ve diğer yeni sefalosporinleri hidrolize eden, plazmidle belirlenen beta-laktamazların yapıldığı saptanmış ve SHV-2 olarak adlandırılmıştır. *Klebsiella* suşlarında sık bulunan SHV-1' den mutasyonla oluşmuştur. Mutasyon SHV-1 beta-laktamazın sefotaksime afinitesinin artması ile sonuçlanmıştır. Daha sonra birkaç Fransız Hastanesinde

seftazidime dirençli *K. pneumoniae* suşlarında seftazidimi hidrolize eden, plazmidle kodlanan yeni bir beta-laktamaz saptanmış, CTX-1 olarak adlandırılmıştır. Nükleotid dizi analizi sonuçları bu enzimin TEM-2'den sadece iki amino asit farklı olduğunu göstermiştir. O tarihten bu yana ESBL' ların sayı ve çeşidinde hızlı bir artış olmaktadır. TEM ve SHV beta-laktamaz türevlerinin sayısı, dizi analizi ve oligotiplendirme ile doğrulanmaktadır ve sırası ile 24 ve 4'e kadar yükselmiştir. Bazıları pekçok ülkede görülürken (SHV-2, SHV-4, SHV-5, TEM-6) , diğerleri çoğunlukla 1-2 ülkede görülmektedir. Örnek olarak TEM-3 Fransa' da, TEM-10-12 ABD ve İngiltere' de yaygındır. Hastanelerde uygulanan ulusal antibiyotik kullanım paternlerindeki farklılıklar, bu enzimlerin dağılımındaki farkları açıklar. ESBL yapan klinik izolatların pekçoğu hastanede yatan hastalardan izole edilmekte ve hastanelerde sıklıkla salgınlara neden olmaktadır. Çoğu *K. pneumoniae* ' de görülür. İngiltere, Fransa ve Portekiz' de hastanelerden izole edilen *K. pneumoniae* suşları ile yapılan son çalışmalar %14-16 oranında ESBL yapıldığını göstermiştir. Fransa' da prevalans 1985'de %1' den az iken 1988' de bu günkü seviyeye ulaşmıştır. ESBL' lar diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de saptanmaktadır ama daha nadirdir. Son bir Fransız çalışmasında *Enterobacter* türlerinin ve *K. oxytoca* ' nın %2-3' ünde fakat *E. coli* ' lerin %0.1' de ESBL saptanmaktadır. 1988' den beri sürdürülen çalışmalar İngiltere ve Portekizde' de *E. coli* ' lerde düşük oranlar vermektedir. Garip olarak *P. mirabilis* suşlarında ESBL nadirdir. Bu türde ESBL yayılımı plazmid konjugasyonun düşük oranda gerçekleşmesi ile bağlantılıdır. ESBL yapan suşlar ile sporadik nozokomiyal salgınlar, bazı hastanelerde endemik bir problem haline gelmiştir. Bazen bakım evlerinden ve diğer uzun süreli bakım kurumlarından getirilen hastalar ile bu tür suşlar hastaneye gelebilir. Daha sonra hastanelerde beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile oluşan seçici baskı, diğer hastaların gastrointestinal ve solunum yollarının kolonizasyonunu açıkca artırır ve bunu enfeksiyon izler. Salgınlara, uzun hastanede kalış, cerrahi girişim, üriner ve arteriyel kateterlerin varlığı ile ilişkili oluşu ve özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda saptanması şaşırtıcı değildir. Salgınlara kontrolündeki başarısızlık, aynı enstitüde ve bazen aynı hastada yeni mutant tipte ESBL görülmesi ile sonuçlanmaktadır. Örnek olarak Clermont-Ferront hastanesinde ilk saptandığı 1984'den bu yana 8 farklı ESBL görülmüştür. Hem plazmidin hem türün yayılımı söz konusudur. Bir de CAZ-7 yapan *K. pneumoniae* ve *E. coli* ' nin aynı hastada saptanması, CAZ-7 ve amikasin genlerinin aynı fragman üzerinde olduğunu, farklı plazmidlere aktarılabilirliğini göstermiştir. Diğer ESBL genlerinin (TEM-3 ve TEM-12) transpozonlarda bulunduğu görülmektedir. Tem-12, TEM-1 taşıyan bir plazmidde tek bir nokta mutasyonu sonucu oluşmuştur. Tek nokta mutasyonları ve farklı beta-laktamaz genleri arasında rekombinasyonlar, bu genlerin endemik olduğu ortamlarda yeni ESBL' ların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Diğer genetik olaylar da ESBL aracılığı ile gelişen direnç katkıda bulunurlar. IS-1 benzeri elemanlar, TEM-6 geninin promotör bölgesine yerleşirler ve TEM-6 ve diğer TEM variantlarının gücünü artırırlar, yüksek düzeyde ESBL yapımına neden olurlar. Ana beta-laktamaz SHV-1' in aşırı yapımı bile seftazidim ve aztreonama direnç gelişmesine neden olur. Son dönemde Fransa, İskoçya ve İspanya' da *E. coli* izolatlarında yeni bir sınıf, TEM türevidir, plazmidle aktarılan beta-laktamaz bulunmuştur. Bunlara TRI beta-laktamazlar denmektedir, beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli ama oksimino? beta-laktamlara (sefotaksim, aztreonam, seftazidim) duyarlıdır (Mayer et al. 1995).

2.17. Kromozomal Genlerle Belirlenen beta-laktamazlar

Bütün gram negatif bakteriler bir miktar kromozomal beta-laktamaz yaparlar. Üretilen beta-laktamaz çoğunlukla türe spesifiktir. Özellikle ampisiline duyarlı izolatlarda beta-laktamaz aktivitesi sıklıkla çok düşüktür. Ya induksiyon ya da kromozomda beta-laktamaz genlerinin sayısında değişikliğe bağlı olarak enzim miktarı artabilir. İndüksiyonu regüle eden genlerin mutasyonu da indüklenebilen beta-laktamazların yapısal olarak aşırı yapımına neden olabilir. Hyperproducer mutantların seleksiyonu, *Enterobacter* bakteriyemisi nedeni ile 3. kuşak sefalosporin kullanmakta olan hastaların %19' unda direnç gelişmesine neden olmuştur. Bush sınıflamasına göre grup 1' de bulunan kromozomal beta-laktamazlar tercihen sefalosporinleri hidrolize ederler ve klavülonik asit ile inhibisyona dirençlidirler. Plazmidle geçen beta-laktamazların çoğunun hidrolizine dirençli olan üçüncü kuşak beta-laktamların çoğunu inaktive ederler (Mayer et al. 1995).

Metallo beta-laktamazlar (Bush grup 3) karbapenemleri hidrolize eder .

Kromozomal beta-laktamazların biyokimyasal yapısı plazmidle geçen enzimlerden tamamen farklıdır. İstisnası pekçok *K. pneumoniae* izolatında bulunan SHV-1 beta-laktamazından ayırt edilemeyen bir kromozomal beta-laktamazdır. SHV-1 beta-laktamaz geni kromozomal bir gen olarak oluşmuş ve daha sonra bir plazmidle aktarılmış olabilir. Daha yaygın olan TEM-1 beta-laktamaz veya herhangi bir plazmidle geçen beta-laktamaz için henüz benzeri ata kromozomal gen bulunamamıştır. Kromozomal genlerin plazmidlerin yapısına girmesi çok korkulan bir tehdittir. Nozokomiyal *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarının *Enterobacter cloacae*' den türemiş plazmidle taşınan bir amp C tipi beta-laktamaz yaptığı bulunmuştur. Oksimino beta-laktamlara direncin yanında süşların 7 alfa metoksi beta-laktamlara ve klavam ve sülfon beta-laktamaz inhibitörlerine oldukça dirençli olduğu bulunmuştur. Son zamanlarda *Citrobacter freundii* ve *K. oxytoca*' dan plazmidle geçen amp-C tipi beta-laktamaz

bulunmuştur. Fransa, Yunanistan ve Pakistan' da da *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında aynı plazmidler saptanmış ve ileri sürülen korkunç tehdidin zaten bütün dünyada yaygın olduğu görülmüştür. Japonya' da bir *Pseudomonas aeruginosa* suşunda plazmidle aktarılabilen, imipenem ve diğer bütün beta-laktamlara direnç gelişmesine neden olan bir beta-laktamaz saptanmış ve ciddi bir tehdit olarak görülmektedir (Mayer, 1995).

Her ne kadar çoklu ilaç direnci sıklıkla plazmidle aktarılmakta ise de, tek yol değildir. Bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri, özellikle *Citrobacter*, *Enterobacter*, indol pozitif *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* ESBL' ı kodlayan kromozomal bir gen taşırlar. Genellikle bazı antibiyotiklerin varlığında indüklenmeleri gerekir. Bakteriler mutasyona uğrayarak bu enzimleri yapısal olarak salgılamaya başlayabilir ve antimikrobiyal ajanlara direnç kazanabilir. Mutasyon tedavi altında da gelişebilir (Mayer et al. 1995).

Enterobacter suşlarında imipenem direnci gelişebilir, hem beta laktamaz yapımını hem de permeabiliteyi azaltan bir mutasyon gerektirir. Kromozomda oluşabilecek diğer mutasyonlar da ilaç duyarlılığında önemli etkilere neden olabilir, özellikle transportta değişikliklere neden olurlar. Plazmide bağımlı ya da bağımsız, bakterilerin mükemmel genetik uyumlarının sonucu, kullanılmakta olan antimikrobiyallere karşı hızla gelişen direnç önemli bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Bu problem hem enfekte kişilerde, hem de normal sağlıklı kolonize kişilerde görülmektedir.

2.18. Beta-laktamazların beta-laktam Direncine Katkısı

Bir bakteri grubunda belirli bir beta-laktamaz ile oluşan antibiyotik direnç düzeyi birkaç değişken ile belirlenir. Bir antibiyotiği hidrolize eden beta-laktamazın etkinliği : Hidroliz hızına (V_{max}), Antibiyotiğe afinitesine (K_m) dayanır.

Diğer değişkenler:

1. Bakteri hücresinde üretilen beta-laktamaz miktarı.
2. Hedef proteinin (PBP) antibiyotiğe duyarlılığı.
3. Antibiyotiğin hücrenin periplazmasına diffüzyon hızıdır.

Bakteri hücresinde beta-laktamazlar antibiyotik direncine birkaç yolla katkıda bulunur. En basit model, penisilinaz yapan stafilokoklardır. Penisilinle karşılaşınca beta-laktamaz yapmaya başlarlar ve ekstraselüler bölgeye ekskrete ederler. Daha sonra iki olay meydana gelir: Penisilin bakteriyi lize eder, beta-laktamaz penisilini hidrolize eder. Eğer penisilin düzeyi minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) altına düştükten sonra canlı bakteri kalmış ise bakteri tekrar ürer (Butler, 1992). Diğer bir model Gram negatif bakterilerde oluşmaktadır:

1. Üretilen beta-laktamaz periplazmik alanda tutulur.
2. Antibiyotik penetrasyonu için hiçbir engel yoktur.

Her iki modelde belirgin bir inokulum etkisi oluşur. MİK, yüksek inokulumda (10^6 cfu/ml), düşük inokulumun (10^2 cfu/ml) 1000 katına yükselebilir. İnfekte eden bakteri inokulumu düşük ise beta-laktamaz üreten *H. influenzae* suşları ile oluşan bazı enfeksiyonlar, düşük düzeyde direnç söz konusu olduğu için ampisilin ile tedavi edilebilir (Butler, 1992).

Diğer bir model TEM-1 beta-laktamaz yapan ampisiline dirençli *E. coli* suşlarıdır. Bu bakteriler beta-laktam moleküllerinin girmesini önleyen bir engele sahiptir (dış membran) ve periplazmik alanda lokalize beta-laktamaz yaparlar. Bu modelde kinetikler daha komplikedir. Enzim stratejik bir bölgeye yerleştirilmiştir, antibiyotik penetrasyonunu engelleyen dış membran ile antibiyotiğin hedefi (sitoplazmik membranda PBP' ler) arasındadır. Bu pozisyonda enzim antibiyotik molekülünü tahrip edebilir. Sonuç olarak az sayıda bakteri ile yüksek düzeyde direnç gelişir (Mayer, 1995).

Enterobacter ve *Pseudomonas* türlerinde olduğu gibi bir beta-laktam ile karşılaşınca yapılan beta-laktamaz miktarı arttığında bu modelde değişiklik olabilir. İndükleyen antibiyotikle bir süre karşılaştıktan sonra yüksek düzeyde beta-laktamaz yapılır, bu nedenle direnç geç olarak ortaya çıkabilir. *Enterobacter* türleri iki? beta-laktam antibiyotikle karşılaşır ve bunlardan biri potent bir indükleyici ise (örnek olarak sefamandol), iki antibiyotik arasında antagonizm gelişebilir (Mayer, 1995).

3. MATERYAL VE METOD

17 Ağustos 1999 Marmara Depremi sonrasında erken dönemde çeşitli çadır kentlerden ve ilçelerden Kocaeli ili Salgın Kontrol Merkezi laboratuvarına ishal şikayeti ile başvuran hastalardan toplam 72 *Shigella* türü bakteri izole edildi (Vahaboglu et al. 2000) . Bu izolatlardan 39'u Kocaeli İli Merkezinden gelen hastalardan, diğerleri çevreden gelen hastalardan izole edilmişti. Merkezden izole edilen 39 suş çalışmaya alındı.

3.1. Bakteri İdentifikasyonu :

3.1.1. Kültür:

Alınan dışkı örnekleri MacConkey Agar ve " *Salmonella Shigella* " (SS) agar gibi daha seçici besiyerlerine ekildi ve plaklar 37°C'de 18 saat tutulup, koloniler incelendi. Mc Conkey ve SS agarda renksiz yani laktoz negatif koloniler seçilerek gram boyama yapılarak ileri tanımlama metotları ile tanımlandı..

3.1.2. Gram boyama:

Lam üzerine tespit edilmiş preparatlar 2 dakika Jansiyen moru ile ve 2 dakika lugol eriyiği ile boyandı. Daha sonra % 96' lik etil alkol ile bir dakika renksizleştirme yapıldı ve sulu fuksin boya ile bir dakika boyanıp kurutuldu ve immersiyon objektifi (x1000'lik büyütme) ile incelendi.

3.1.3. Biyokimyasal Testler:

Aşağıda belirtilen biyokimyasal testlerle *Shigella* ön tanımlamaları yapıldı.

3.1.3.1. TSI:

Mac Conkey agarda üreyen laktoz negatif ve gram negatif basillerden "Triple Sugar Iron Agar "(üç şekerli demirli agar) besiyerine ekim yapıldı. İğne ile saf kültürden alınan örnekten önce besiyerinin yatık kısım yüzeyine bir çizgi ekimi yapıldı sonra dip kısma bir batırma ekimi yapıldı, 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. TSI besiyeri glukozdan

asit ve gaz oluşumunu (glikoz fermantasyonunun) laktoz ve/veya sükröz kullanımını ve H₂S oluşmasını incelemede değer taşır. Besiyerinde bulunan fenol kırmızısı ayırıcı asit ortamda sarıya dönüşür. TSI besi yerinde dip kısımda sarı , yatık kısımda kırmızı-pembe renk oluşan, gaz ve H₂S oluşturmeyen bakteriler ileri tanımlamaya alındı (Koneman et al. 1992).

3.1.3.2. Sitrata kullanımı:

Saf kültürden Simons sitrata besiyeri yüzeyine çizgi ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanan bakteriler besiyerindeki brom timol mavisi ayırıcına etki ederek prusya mavisi renk oluştururlar (Koneman et al. 1992). *Shigella* türleri sitrata besiyerinde üremezler dolayısı ile sitrata negatif bakteriler *Shigella* yönünden ileri incelemeye tabi tutuldu.

3.1.3.3. Üre hidrolizi:

Saf kültürden Christensen üre agar besiyerinin yüzeyine ekim yapıldı. 24 saat, bazen 48 saat 35 °C'de inkübasyondan sonra üreyi hidrolize eden bakteriler besiyerindeki fenol kırmızısı ayırıcının sarı rengini kırmızıya çevirirler (Koneman et al. 1992). *Shigella* türleri üreyi hidroliz etmez.

3.1.3.4. İndol:

SIM agar (Oxoid) besiyerine batırma kültür yöntemi ile ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra Kovacs ayırıcı damlatılıp, indol oluşması kırmızı renk oluşumu ile gözlendi (Koneman et al. 1992).

3.1.3.5. Hareket testi:

SIM agar (Oxoid) besiyerine batırma kültür yöntemi ile ekim yapıldı. Besiyerinin yarısına kadar ekildi. 24 inkübasyondan sonra üst kısımda bulanıklık oluşup oluşmadığı alt kısım ile kıyaslanarak değerlendirildi (Koneman et al. 1992). *Shigella* hareketsiz bir bakteri türüdür.

3.1.3.6. Serolojik tiplendirme:

Yukarıdaki testlerle *Shigella* olduğu düşünülen bakteriler lamda O somatik antijenlerine karşı spesifik grup antiserumları ile karşılaştırıldı. Bu amaçla grup A (*Shigella dysenteriae*), grup B (*Shigella flexneri*), grup C (*Shigella boydii*) ve grup D (*Shigella sonnei*) antiserumları (Difco Laboratories, Detroit) kullanıldı.

3.2. Disk Diffüzyon Yöntemi ile Ampisilin Direncinin ve Çift Disk Sinerji Testi ile Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması

Antibiyotik duyarlılık testi, disk difüzyon yöntemi ile National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'in önerilerine uyularak yapıldı (NCCLS, 1999). Antibiyotik duyarlılık testinde Mueller Hinton Agar kullanıldı.

3.2.1. Mueller-Hinton Agarın Hazırlanması:

Mueller-Hinton (MH) agar (Oxoid), ticari olarak satılan preparatından üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Otoklavdan çıktıktan sonra su banyosunda 45-50 °C ye kadar soğutuldu. Besiyeri, cam veya plastik petrilere derinliği 3-4 mm olacak şekilde döküldü. Besiyeri dökülen petrilere düzgün bir yüzeyde soğumaya bırakıldı. Agar oda ısısına gelince kullanıldı, aynı gün kullanılmayacaksa buzdolabında saklandı. Nem kaybını önlemek için plastik bir torba içinde saklandı. Besiyerleri hazırlandıktan sonra 7 gün içinde kullanıldı. Besiyerleri kullanılmadan önce seçilen bir tanesi 35 °C'de 24 saat inkübe edilerek sterilite kontrolü yapıldı. Besiyeri hazırlandığında pH 'sı kontrol edildi, oda ısısında 7.2-7.4 olarak tesbit edildi. Kullanmadan önce besiyerinin yüzeyinde fazla nem gözlemlendiğinde plaklar 35 °C' lik etüvde kapakları açık olarak, nem buharlaşana dek (10-30 dak) tutuldu. Yüzeyde nem damlacıkları varken inokülasyon yapılmadı.

3.2.2. Bulanıklık Standardı:

İnokulum yoğunluğunun standardize edilmesi için BaSO₄ bulanıklık standardı (0.5 McFarland Standardı) kullanıldı. Bu standart yaklaşık 10⁸ cfu/ml bakteri yoğunluğuna eşit bulanıklık gösterir.

3.2.3. Besiyerinin İnokülasyonu:

Agar kültüründen 4 ila 5 koloni alındı, 4-5 ml buyyon besiyerine aktarıldı. Buyyon kültürü 0.5 McFarland bulanıklığa ulaşınca kadar 35-37 °C'de inkübe edildi. Bulanıklık ayarlamasından sonraki 15 dak içinde süspansiyon içine pamuklu eküvyon batırıldı. Eküvyon Mueller-Hinton agarın tüm yüzeyine sürülerek inokulum yayıldı. Steril bir pens ile veya dağıtıcı ile 15 dak içinde ampisilin diskleri yerleştirildi. Disklerin yerleştirilmesinden sonra plaklar ters çevrilerek 35 °C'lik etüve kaldırıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra plaklardaki zon çapları cetvel ile ölçüldü, NCCLS' in önerdiği

duyarlı, orta derecede duyarlı, dirençli sınırlarına göre değerlendirildi.

3.2.4. Çift disk sinerji testi:

Çift disk sinerji testi için disk diffüzyon testi her suş için 9 cm çaplı 2 ayrı petri kutusunda yapıldı. Her petri kutusuna 7 antibiyotik diski yerleştirildi. Birinci petri kutusuna ortada amoksisilin-klavülonik asid (AMC) diski ve bundan 2.5 cm uzaklıkta olacak şekilde sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), ampisilin (AMP), aztreonam (ATM), sefoperazon (CFP), sefoperazon-sulbaktam; ikinci petri kutusuna sefoksitin (FOX) ortada olmak koşulu ile her biri 2.5 cm uzaklığa gelecek şekilde imipenem (IMP), CFP, CAZ, CTX (IMP, CFP ve CTX disklerinin arasında olacak biçimde), ATM, amikasin (AK) yerleştirildi (Hall et al. 1993).

AMP'e dirençli (inhibisyon zonu 10 mm'den az olan), klavülonik asidden etkilenen (AMP diski çevresindeki inhibisyon zonundan en az 6 mm daha geniş bir inhibisyon zonu gösteren) suşlar, üçüncü kuşak sefalosporinlere ya da ATM'a dirençli ve FOX'den etkileniyorsa (inhibisyon zonu 12 mm'den fazla) ya da AMP'e dirençli, klavülonik asidden etkileniyor, FOX'e duyarlı ve üçüncü kuşak sefalosporinler ya da ATM ile AMC arasında yardımlaşma varsa grup 2b' ya da olası ESBL yapan bakteri olarak kabul edilir. Yardımlaşma CTX, CAZ ya da ATM çevresindeki inhibisyon zonunun AMC'e bakan yüzünün belirgin olarak genişlemesi ya da iki diskin arasında inhibisyon olan bir alanın olmasıdır (Vahaboğlu, 1998).

AMC'den yardım alamayan, FOX'den etkilenmeyen, CTX, CAZ, ATM ya da CFP diskleri FOX ya da IMP tarafından indüklenen bakteriler grup 1 ya da kromozomal beta laktamaz yapan bakterilerdir. Üçüncü kuşak sefalosporinlerin ya da ATM'in FOX ya da IMP'e bakan yüzlerinde inhibisyon zonunun belirgin olarak daralması indüklenme olarak tanımlanır (Vahaboğlu, 1998).

3.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması

Testi uygulamak için değişik konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan eklenmiş bir seri agar besiyeri hazırlandı. Besiyerleri denenecek organizmanın standardize süspansiyonu (10^4 CFU) ile inoküle edildi. Plaklar 35°C 'de bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri incelendi ve antibiyotiğin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) saptandı. MİK değerleri bakterinin gözle görülür üremesinin inhibe olduğu en düşük antibiyotik değeri olarak kabul edildi.

3.3.1. Antibiyotik solusyonlarının hazırlanması :

Stok solüsyon hazırlamak için antibiyotik miktarları aşağıda belirtilen formüle göre tartılıp uygun çözücüde çözüldü.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon (mg/ml)}}{\text{Antibiyotik potensi (mg/ml)}}$$

3.3.2. Stok çözeltilerin hazırlanması

Birçok antibiyotik sulandırıldıktan sonra çözelti halinde -20°C 'de saklanabilir. Kullanılacakları gün çözülmeli ve aynı stok tekrar kullanılmamalıdır. Derin dondurucuda saklanacak antibiyotiklerin en az 1000 mg/ml konsantrasyonda hazırlanması gerekir. Bazı antibiyotiklerin ise kullanılacakları gün hazırlanması gerekmektedir. Bazı ilaçlar su dışındaki çözücülerle çözülmelidir. Böyle durumlarda antibiyotiğin çözülmesi için gereken en az miktarda çözücü kullanılır. Çözüldükten sonra su ya da tampon ile uygun konsantrasyonda hazırlanır.

Antibiyotiklerin hazırlanmasında kontaminasyon olması nadirdir, ancak gerekirse filtrasyon ile sterilize edilir.

Testte kullanılacak antibiyotik konsantrasyonları, direnç sınırlarını içine alacak şekilde saptandı. Agar dilüsyon yönteminde antibiyotik agar içine kondu. Böylece her plakta antibiyotiğin farklı konsantrasyonları elde edilmiş oldu.

Bu yöntem için NCCLS'in önerdiği besiyeri olan Mueller-Hinton agar kullanıldı. Besiyeri hazırlandıktan sonra antibiyotik çözeltisi eklenmeden önce $48-50^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda tutuldu. Antibiyotik sulandırmaları hazırlanıp petrilere seri dilüsyonları dağıtıldı ve üzerine 50°C 'ye kadar soğutulmuş agar eklendi ve çok iyi karıştırıldı. Her test için antibiyotik içermeyen kontrol besiyerleri hazırlandı.

Bakteri agar yüzeyine inokülatör ile inoküle edildi. Kullanılan alete bağlı olarak her plağa 20 ila 48 bakteri aynı anda inoküle edilir.

3.3.3. İnokulum Hazırlanması:

Katı besiyerinde üremiş olan bakterinin 4-5 kolonisi bir sıvı besiyerine ekildi. Bu amaçla Mueller-Hinton veya Brain Heart infusion broth kullanılır. Bu süspansiyon belirgin bir bulanıklık oluncaya dek 35°C 'de inkübe edildi. Steril broth, serum fizyolojik ya da distile su ile bulanıklık 0.5 Mc Farland standardına göre ayarlandı. Bu inokulum steril bir brothda veya serum fizyolojik ile 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 cfu/ml elde

edildi. Birçok inokülatör 1-2 µl inoküle ettiğinden agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama 10^4 cfu/ml olur. Agar plakları inoküle edilirken yüzeylerinin kuru olması gerekir. Bu amaçla plaklar kapakları açık olarak bir etüvde tutuldu, ancak aşırı kurumadan kaçınıldı. Hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan inokülatörün tablasındaki çukurlara sırayla damlatıldı. Buradan alınan süspansiyon agar yüzeyine aynı sıra ile bırakıldı. Önce antibiyotik içermeyen kontrol besiyeri bundan sonra da en düşük konsantrasyondan başlayarak farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklara inokülasyon yapıldı.

Bakterilerin ekildiği noktalar tamamen kuruyana kadar plaklar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Bundan sonra plaklar ters çevrilerek 35°C'de 16-20 saat inkübe edildi.

3.4. Transkonjugasyon

Otuziki *Shigella*'nın tümüne transkonjugasyon deneyi uygulandı. Bunun amacı AMP direncini *Shigella*'dan, duyarlılık paterni bilinen *E. coli* K-12, J-53-1 veya *E. coli* K-12, J-62-1 veya *E. coli* K-12, J-53-2'ye aktarmaktı. *E. coli* K-12, J-53-1 ve J-62-1 nalidiksik asite, *E. coli* K-12, J-53-2 rifampisine dirençli, diğer antimikrobiallere duyarlıdır. Böylece ampisilin direncini alan, kendisi zaten rifampisine dirençli olan *E. coli* transkonjugatı elde edildi.

3.4.1. Antibiyotikli Besiyerlerinin Hazırlanması:

100 µg/ml Rifampisin içeren 100 ml besiyeri hazırlamak için $100 \mu\text{g/ml} \times 100\text{ml} = 10\,000 \mu\text{g} = 10 \text{ mg} = 0.01 \text{ g}$ rifampisin gereklidir.

Elimizde 32 suş olduğu için $32 \text{ bsy} \times 20\text{ml} \times 100 \mu\text{g/ml} = 64.000 \mu\text{g} = 64\text{mg} \times 10 \text{ ml} = 640 \text{ mg} = 0,64 \text{ g}$ gerekmektedir.

0,64 g rifampisin tartılıp, 10 ml distile suda eritildi. 1-2 damla NaOH eklendi ve 640 ml besiyerine antibiyotik solüsyonundan 1 ml eklendi ve çözünmesi sağlandı. Aynı şekilde $6.4 \mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren 100 ml besiyeri hazırlamak için $6.4 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml} = 640 \mu\text{g} = 0.64 \text{ mg} = 0.0064 \text{ g}$ ampisilin gereklidir.

Elimizde 32 suş olduğuna göre $32 \text{ bsy} \times 20 \text{ ml} \times 6.4 \mu\text{g/ml} = 4,096 \mu\text{g} = 4.1 \text{ mg/ml} \times 10\text{ml} = 41 \text{ mg} = 0.04 \text{ g}$ gerekmektedir.

0,04 g ampisilin tartılıp, 10 ml distile suda eritildi, 640 ml besiyerine antibiyotik solüsyonundan 1ml eklendi.

3.4.2. İşlem:

Ampisiline dirençli verici bakteriler ve rifampisine dirençli alıcı bakteri ayrı ayrı sıvı besiyerlerine ekildi ve 4 saatlik inkübasyondan sonra alıcı bakteriden, verici bakterilere birer ml eklendi. Oluşan karışım 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, dipte oluşan çökelek antibiyotiksiz agara ekilip bir gece inkübe edildi, Ertesi sabah üreyen karışık bakterilerden alınarak iki antibiyotik içeren besiyerlerine ekim yapıldı. Alıcı bakteri *E. Coli* K-12, J-53-2 ise ampisilin + rifampisin içeren antibiyotikli besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekilip, bir gece inkübe edildi. Transkonjugasyon oluşur ise AMP direnci *Shigella*' dan *E. coli*' ye aktarılır. 100 µg/ml Rifampisin+8 µg/ml ampisilin içeren besiyerinde rifampisinden dolayı *Shigella* üreyemez, AMP' den dolayı da orijinal *E. coli* üreyemez, sadece AMP direncini alan, kendisi zaten rifampisine dirençli olan *E. coli* üreyebilir.

3.5. Enzim İzolasyonu ve İzoelektrik Noktanın Saptanması

3.5.1. Enzim İzolasyonu

Eppendorflara 250 µl 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.0) dağıtıldı, Subinhibitör konsantrasyonda antibiyotik içeren tam bir petriden eküvyonla bol olarak bakteri alınıp, Eppendorf içindeki fosfat tampon içinde suspansiyon hazırlandı, kuru buzda 15 dak, 37°C' lik su banyosunda 10 dak bekletildi. Bu döngü 10 kez tekrarlandı ve 12,000 g'de 15 dak santrifüj edilip, üst kısım yeni bir Eppendorfa alındı, izole edilen enzimler eksi 20°C'de saklandı.

3.5.2. İzoelektrik Nokta Jelinin Hazırlanması

3.5.2.1. Akrilamid-bisakrilamid %25' lik stok solüsyonunun hazırlanması:

Akrilamid 24.25 g

Bisakrilamid 0.75 g

Distile su ile 100 ml' e tamamlanıp, filtre edildi (+4°C' de 1 ay saklanabilir).

3.5.2.2. Riboflavinin hazırlanışı:

Riboflavin 5'P 50 mg

Distile su 50 ml

Filtre edildi (+4°C' de 1 ay saklanabilir).

3.5.2.3. %10' luk Amonyum persülfatın (APS) hazırlanışı:

APS 100 mg

Distile su 1 ml

3.5.2.4. %25' lik Gliserol stoğunun hazırlanışı:

(2500 ml: 3140 g):Stoktan 20 ml alınıp 100ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.5.2.5. Jelin hazırlanışı:

Distile su 5.5 ml

Akr/bisakr %25' lik 2 ml (sonuçta %5' lik)

Gliserol %25' lik 2 ml (sonuçta %5' lik)

Ampholyte 0.5 ml (pI: 3-10, taşıyıcı protein)

Riboflavin 50 µ l

APS 50 µ l

TEMED 10 µ l

3.5.2.6. İşlem:

Camlar ısıtıldı. APS, TEMED eklendikten sonra hızla Polimerizasyon olacağı için karışım süratle cam ile plak arasına pipetle sızdırıldı. Güneş ışığında polimerize oluncaya kadar bekletildi (Polimerize olduktan sonra hemen kullanılmayacaksa strech film ile sarılarak buzdolabında saklanabilir).

Polimerize olan jel camla birlikte kenardan kaldırılarak plaktan alındı.Sabit delikleri olan bir plastik şerit jelin ortasına yerleştirildi.TEM-1 ve SHV-1 kontrol suşları da dahil olmak üzere her örnekten yaklaşık beşer µl enzim ayrı ayrı plastik şeritteki gözlere yüklendi. 5 dak beklenip, fazlası kurutma kağıdı ile alındı. Şerit çıkarıldıktan

sonra bir tarafta her iki kutuba 1-2 µl kan kondu. Islatılan elektrodların üzerine jel degecek şekilde yerleştirildi. İlk 15 dakika 100 V'da daha sonra 250 V'da yürütüldü. Her iki uçtaki kan birleşene kadar yürütmeye devam edildi (yaklaşık bir saat). Yürütme tamamlandıktan sonra jel elektrodların üzerinden alındı. 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde hazırlanan 1 mM nitrosefin ile boyandı. Standart olarak kullanılan TEM-1 (pI: 5.4) ve SHV-1 (pI: 7.6) ile kıyaslanarak izoelektrik noktalar saptandı.

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen 32 *Shigella* suşunun hepsi PCR' la incelenerek TEM-1 ve SHV genleri yönünden araştırıldı.

3.6.1. DNA Ekstraksiyonu

Agarda üretilmiş çalışma suşları Eppendorf içinde, 250 µl ajirojen suda swapla yoğun olarak süspanse edildi. Daha sonra 10 dakika kaynatılıp, 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant PCR deneylerinde DNA izolatu olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak TEM-1 ve negatif kontrol olarak da J-53-1' den elde edilen DNA ekstraktları kullanıldı. Ekstraktlar içindeki DNA miktarı tayin edilmedi. Bu nokta da kontaminasyon riski yüksek olduğu için tüm ek ve zorunlu olmayan işlemlerden kaçınıldı.

3.6.2. Reaksiyon Karışımı:

30 pmol her primerden,
10 µl Tag DNA polimeraz reaksiyon tamponu
6 µl 2.5 mM MgCl₂
0,8 µl dNTP karışımı (her biri 25mM olan karışımından)
2.5 U Tag DNA polimeraz
5 µl DNA ekstraktı
Deiyonize su ile 100 µl' e tamamlandı.

3.6.3. Primerler

TEM sekansını çoğaltmak için:
Pozisyon 350 U 5'-AACATTTCCGTGTCGCCCTTAT-3'

Pozisyon 1092 L 5'-AACTACGATACGGGAGGGCTTA-3'
SHV sekansını çoğaltmak için:

Pozisyon 278 U 5'-CGGTCAGCGAAAAACACCT-3'

Pozisyon 733 L 5'-TCCC GCAGATAAATCACCAC-3'

3.6.4. PCR döngüsü

Termocycler ile (Techne, Progene) 30 amplifikasyon döngüsü olacak şekilde, 95°C' de 5 dakika ilk denatürasyondan sonra 30 siklus aşağıdaki gibi uygulandı (Vahaboglu et al. 1996).

1 dakika 95 °C' de denatürasyon,

1 dakika 55 °C' de annealing,

1 dakika 72 °C' de extension

PCR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. %1.5 agaroz içeren jel, 1xTBE tampon ile hazırlandı. Elektroforez 1xTBE tampon içerisinde, 100-150 V' da 20-30 dak da tamamlandı. Etidyum bromid ile boyandıktan sonra transilüminatör üzerinde UV ışıkta incelendi.

Oluşan DNA bantları, moleküler ağırlık markerının bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.7. Koloni Hibridizasyonu

Shigella izolatlarının OXA-1 genleri yönünden incelenmesi amacıyla koloni hibridizasyonu yapıldı.

3.7.1. Gerekli Solüsyonlar

3.7.1.1. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) solüsyonu

10gr SDS (mw=288.37) 100 ml'ye deyonize su ile tamamlanıp çözüldü

3.7.1.2. Denatürasyon Solüsyonu

% 0,1 SDS

1,5 M NaCl

0,5 N NaOH

3.7.1.3. Nötralizasyon Solüsyonu

3 M NaCl

1 M Tris (pH=7,5)

3.7.1.4. Buffer 1

100 mM Maleik Asit (pH 7,5)

150 mM NaCl

3.7.1.5. Buffer 2

% 1 Blocking Reagent Buffer 1 içinde

3.7.1.6. Buffer 3 Solüsyonu

100 mM Tris (pH=9,5)

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

3.7.1.7. Standard Hibridizasyon Buffer

%1 Blocking Reagent

5x SSC

% 0,02 SDS

% 0,1 N-lauryl Sarcosil

3.7.2. Uygulanacak Prosedür

- 1.Uygun ölçüde membran kesildi
 - 2.El değmeden küçük kareler çizildi .
 - 3.Membran ve Isosensitest agara kondu.
 - 4.Her suştan tek koloni alınarak, membrana özeyle (membran zedelenmeden) sürüldü.
 - 5.Membran bir gece etüvde bekletildi.
 - 6.Membran el değdirilmeden ;
 - %10 SDS emdirilmiş kurutma kağıdı üzerine bakteri kolonileri üstte kalacak şekilde kondu (15 dk).
 - Denatürasyon Solüsyonu emdirilmiş kurutma kağıdı üzerine kondu (15 dk).
 - Nötralizasyon Solüsyonu emdirilmiş kurutma kağıdı üzerine kondu(15 dk).
- Bu aşamalar oda ısısında gerçekleştirildi.

7. Membran cam petri içinde 120°C 'de 30 dk (ya da UV 'de 3 dk) Tutulup, sonra Buffer 1 ile yıkandı.

8. Membran naylon torba içersinde 1 saat boyunca Prehibridizasyon Sol. da (60 °C'de) tutuldu. Bu arada Prob 60 °C'de 15 dk tutulup -20°C 'ye kaldırıldı.

9. Bir saatin sonunda Prehibridizasyon Sol. boşaltılıp yerine Prob (Digoxigenin işaretli PCR ürünü) konuldu. Naylon kapatılıp. 60°C'de sabaha kadar tutuldu.

10. Sabah Prob kendi şişesine boşaltıldı.

11. Membran;

- 2 kez 15 dk 2xSSC %0,1 SDS ile oda ısısında yıkandı (çalkalayıcıda),
- 2 kez 15 dk 0,2SSC %0,1 SDS ile 60 °C'de yıkandı (çalkalayıcıda)
- 15 dk Buffer 1'de yıkandı (çalkalayıcıda)
- 15 dk Buffer 2'de yıkandı (çalkalayıcıda) ve 30 dk 37°C'de Anti-Dig AP'de tutuldu (naylonda).
- 2 kez 30 dk Buffer 1'de yıkandı.
- 5 dk Buffer 3'de yıkandı.

12. Naylonda Buffer 3'lü renklendirme solüsyonunda (alkalen fosfataz substratı) bırakıldı ve pozitif kontrole göre değerlendirildi

4. ÇALIŞMA AKIŞI

- 1 Bakteri İdentifikasyonu
- 2 Disk Diffüzyon yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması
- 3 Çift Disk Sinerji Yöntemi İle Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması
- 4 Agar Dilüsyon Yöntemi İle Orijinal Suşların Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması
- 5 Transkonjugasyon
- 6 Enzim İzolasyonu ve İzoelektrik Noktanın Saptanması
- 7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- 8 Koloni Hibridizasyonu

5.3. Çift Disk Sinerji Yöntemi İle Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması

Çift Disk Sinerji Testi ile penisilin sınıfı antibiyotik ve klavulanat inhibitörlerinin ESBL yapma saptanması.

5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Orijinal Suşların Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması

Agar Dilüsyon yöntemi ile orijinal suşların amikasin, meropenem, ceftazidim, siprofloksasin, gentamisin, klavulanat ve sulbaktam antibiyotiklerine tetrasiklin MİK, kanamisin SMD ve teikoplanin MİK, İle rifampin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri saptanması tablo 5 de görülmektedir.

5. SONUÇLAR

5.1. Çalışmaya alınan bakteriler:

Çalışmaya alınan 39 *Shigella* türünün 25 tanesi *Shigella flexneri*, 3 tanesi *Shigella boydii*, 10 tanesi *Shigella sonnei*, 1 tanesi *Shigella dysenteriae* olarak tanımlandı.

5.2. Disk Diffüzyon yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması

Disk diffüzyon yöntemi ile toplam 39 suşun 32'sinde (% 82) AMP direnci saptandı. Ampisilin direnci olan 32 suşun 25'i (%78) *S. flexneri*, 7'si (%22) *S. sonnei* idi.

5.3. Çift Disk Sinerji Yöntemi İle Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının Araştırılması

Çift Disk Sinerji Testi ile pozitif sonuç elde edilemedi ve dolayısı ile izolatlarımızda ESBL yapımı saptanamadı.

5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Orijinal Suşların Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarının Saptanması

Agar dilüsyon yöntemi ile orijinal suşların amoksisilin-klavulanat, ampisilin, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin, kloramfenikol, sulfametoksazol-trimetoprim, tetrasiklin MİK' ları saptandı. Sonuçlar tablo 4 de görülmektedir. Bu tablonun MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri olarak sunumu da tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 4. Shigella izolatlarının MIK değerleri

Izolat tanımı	AMP	SXT	AMC	Tetrasiklin	Kloramfenikol	Cipro	Genta	CAZ
392	128	32	32	128	256	0,125	1	1
276	256	64	32	128	256	0,125	1	1
967	64	32	32	128	256	0,125	1	1
649	128	16	32	128	256	0,125	1	1
428	128	0,25	32	128	256	0,125	1	1
968	128	32	32	128	256	0,125	1	1
229	128	0,25	32	0,5	256	0,125	1	1
463	64	0,25	32	128	256	0,125	1	1
233	64	64	32	128	256	0,125	0,5	1
77	32	0,25	16	0,5	64	0,125	0,5	1
59	256	64	256	128	256	0,125	0,5	1
499	64	0,25	32	128	256	0,125	1	1
699	64	64	16	128	256	0,125	0,5	1
548	64	0,25	32	128	256	0,125	0,5	1
505	64	64	16	128	256	0,125	1	1
635	128	32	32	64	256	0,125	1	1
980	64	0,25	32	64	256	0,125	0,5	1
721	256	64	256	128	64	0,125	0,5	1
158(758)	128	0,25	32	128	256	0,125	1	1
253	128	32	32	64	256	0,125	0,5	1
33	64	0,25	32	128	256	0,125	0,5	1
35	128	0,25	32	128	256	0,125	0,5	1
5	1	64	1	128	256	0,125	0,5	1
15	1	64	1	128	256	0,125	0,5	1
385	128	64	32	128	256	0,125	0,5	1
997	1	64	1	128	256	0,125	0,5	1
894	256	64	32	64	256	0,125	1	1
552	256	64	64	64	256	0,125	1	1
604	64	64	16	128	256	0,125	0,5	1
617	256	64	32	128	256	0,125	0,5	1
41	128	16	32	0,5	64	0,125	0,5	1
387	256	64	32	128	256	0,125	0,5	1
609	4	0,25	1	0,5	64	0,125	0,5	1
575	256	64	16	128	64	0,125	0,5	1
649	256	64	32	128	256	0,125	1	1
234	1	64	1	0,5	64	0,125	0,5	1
583	256	64	64	0,5	128	0,125	0,5	1

Tablo 5: *Shigella* izolatlarının antibiyotik minimal inhibitör konsantrasyonları (MIC 50 ve MIC 90 değerleri)

	BAKTERİ					
	<i>S. boydii</i> n:3	<i>S. dysenteriae</i> n:1	<i>S. flexneri</i> n:25		<i>S. sonnei</i> n:10	
	MIK 50	MIK 50	MIK 50	MIK 90	MIK 50	MIK 90
Amoksisilin-klavulanat	16	1	32	32	1	256
Ampisilin	32	1	128	256	2	256
Seftazidim	1	1	1	1	1	1
Siprofloksasin	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Gentamisin	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1
Kloramfenikol	128	4	256	256	64	64
Sulfametoksazol-trimetoprim	64	0,5	32	64	0,5	64
Tetrasiklin	2	0,5	128	128	0,5	128

MIK 50, tüm izolatların yarısını inhibe eden konsantrasyon; MIK 90, tüm izolatların %90'ını inhibe eden konsantrasyon. MIK 90 değerleri 10 ve daha fazla izolat için hesaplanmıştır

S. flexneri olarak tiplendirilmiş suşlar (25 adet) çoklu antibiyotik direnç fenotipine sahip oldukları görüldü. Tüm *Shigella* türleri seftazidim, siprofloksasin ve gentamisin'e duyarlı bulundu.

5.5. Transkonjugasyon

Ampisilin dirençli 32 suшта transkonjugasyon denendi ve hepsinden de ampisilin dirençli *Escherichia coli* J-53-2 transkonjugatı elde edildi.

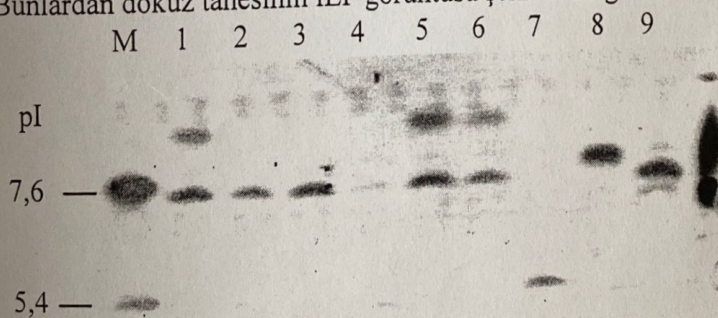
5.6. Enzim İzolasyonu, İzoelektrik Noktanın Saptanması ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Transkonjugasyon ile elde edilmiş ampisilin dirençli suşların 27' sinde enzim ekstraksiyonu ve izoelektrik odaklama çalışması yapıldı. Bunlardan 18' inde pI:7.4' de odaklanan bir enzim gözlemlendi. SHV primerleri ile yapılan PCR deneylerinde ise bir izolat hariç pozitif sonuç alınmadı. Bu da bize pI 7,4 enzimlerin SHV türü olmadıklarını düşündürdü. PCR ile SHV geni saptanan tek izolat pI 7,6 noktasında bir enzim olduğu için bu da SHV-1 olarak değerlendirildi. Sonuçlar tablo 6' da görülmektedir.

Tablo 6. IEF metodu ile rifampisin-ampisiline dirençli E. Coli transkonjugatlarında saptanan enzimler

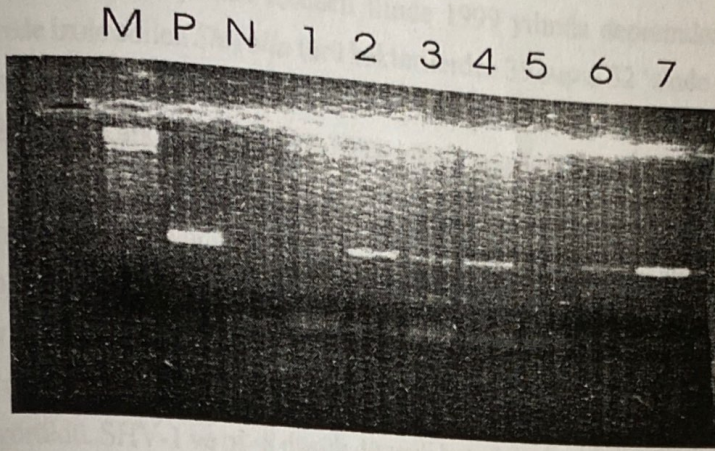
No	bakteri	pI:7,4	pI:5,4	pI:7,6	pI:8,5	pI: 7,8
552	transkonjugat	*				
997	transkonjugat		*			
575	transkonjugat		*			
59	transkonjugat		*			
635	transkonjugat	*				
5	transkonjugat		?			
387	transkonjugat	*				
35	transkonjugat	*				
583	transkonjugat		*			
236	transkonjugat		*		*	*
609	transkonjugat		*	*		*
968	transkonjugat	*	*			
967	transkonjugat	*				
33	transkonjugat	*				
392	transkonjugat	*				
894	transkonjugat	*				
253	transkonjugat	*				
980	transkonjugat	*				
233	transkonjugat	*			*	
385	transkonjugat	*				
548	transkonjugat	*				
649	transkonjugat	*				
699	transkonjugat	*			*	
604	transkonjugat	*			*	
721	transkonjugat		*			
77	transkonjugat			*		
463	transkonjugat	*				

Bunlardan dokuz tanesinin IEF görüntüsü şekil 1' de görülmektedir.



Şekil 1: IEF Jelinde dokuz transkonjugatın beta-laktamaz enzimleri. M kuyucuğu, TEM-1 (pI 5,4) ve SHV-1 (pI 7,6); 1-3, 5 ve 6, pI 7,4 enzimler; Kuyucuk 7, pI 5,4 (TEM-1) enzimi; kuyucuk 8, pI 7,6 (SHV-1) enzimi.

Transkonjugatların 21'inde tek tür beta-laktamaz bulundu. Bunların altısında IEF ile pI: 5.4 olan bir enzim ve PCR ile TEM geni saptandı (Şekil 2).



Şekil 2: TEM primerleri ile PCR deneyi. M, marker; P, pozitif kontrol; N, negatif kontrol; kuyucuklar 1-7, transkonjugatlardan yapılan PCR deneyi ürünleri.

Ampisilin direnci kodlayan ve TEM orijinli pI noktası 5,4 olan bu enzim TEM-1 olarak değerlendirildi. Geri kalanların 14 tanesinde ise pI:7.4 olan bir enzim ve bir tanesinde pI: 7.6 olan SHV-1 enzimi bulundu. Toplam 27 suşun dördü iki enzim ikisi ise üç enzim eksprese etmekte idi.

5.7. Koloni Hibridizasyon

Koloni Hibridizasyonu yöntemi ile membrana aktarılan bakteriler OXA-1 probu ile işleme tabi tutuldu. Bu işlem pI 7,4 ve daha yukarı noktalarda bulunan enzimlerin OXA-1 kökenli olup olmadığını test etmek için yapıldı. Sonuçlar negatif bulundu.

6. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada Kocaeli ilinde 1999 yılında depremden sonraki ilk bir aylık sürede izole edilen *Shigella* türü bakterilerden 39 suşun 32 'sinde (% 82) ampisilin direnci saptandı.

BÜKE ve arkadaşları 1996-1998 yılları arasında yaptıkları çalışmada *Shigella* türü 12 olguda %58 oranında ampisilin direnci saptamışlardır (Büke et al. 1999). Ampisiline dirençli izolatların çoğunun *Shigella flexneri* (%78,1) olduğu görüldü. Ayrıca bunların üç veya dört antibiyotiğe dirençli oldukları saptandı. Beta-laktamaz üreten *Shigella* türleri isoelectric focusing yöntemi ile tanımlandı ve TEM-1 ve pI noktası 7,4 olan bir enzimin çok yaygın olarak bizim izolatlarımızda ampisilin direncinden sorumlu olduğu görüldü. SHV-1 ve pI>8 düşük düzeyli beta-laktamazlara sahip oldukları bulundu. Koloni hibridizasyon yöntemi ile bu izolatların OXA-1 taşımadıkları görüldü.

Maraki ve arkadaşları 1991-1995 yılları arasında topladıkları 52 *Shigella* izolatında % 46 oranında ampisilin direnci saptadılar. Yapılan çalışmada ayrıca % 48 tetrasiklin, % 44.2 kloramfenikol, % 28.8 kotrimoksazol direnci saptadılar. *Shigella flexneri* 'nin *Shigella sonnei* 'ye göre ampisilin, tetrasiklin ve kotrimoksazol direncinin daha yüksek oranda olduğunu belirttiler. *Shigella* izolatlarındaki beta-laktamazların tanımlanmasında isoelectric focusing yöntemini denediler. OXA-1, TEM-1 ve pI>8 düşük düzeyli beta-laktamazlara sahip olduklarını gördüler. Ayrıca *S. flexneri* türlerinde OXA-1'in TEM-1'e baskın olduğunu saptadılar (Maraki et al. 1998).

Navia ve arkadaşları da 1999 ' da 5 yaşın altındaki çocuklarla yaptıkları çalışmada 86 *Shigella* izolatı elde ettiler. Bunlardan 78 'i (%90) *Shigella flexneri* 4'ü *Shigella dysenteriae*, diğer 4'ü de *Shigella sonnei* olarak tanımlanmıştır. *Shigella* türleri arasında ampisilin (%81.8), kloramfenikol (%72.7), tetrasiklin (%96.9), ve ko-trimoksazol (%87.9) direnci saptanmıştır. Ampisilin direncinden %85.1 OXA-1, %14.8 TEM-1 tipi beta-laktamazların sorumlu olduğu bulunmuştur (Navia et al. 1999).

Şigelloz tedavisinde ilk sırayı önceleri sulfonamidler alırken Japonya'da beş yıl süren araştırma sonucu *Shigella flexneri* 'de sulfonamidlere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir (Suzuki et al. 1986).

Ampisilinin keşfinden sonra şigelloz tedavisi için aranan ilacın bu olduğu düşünüldü fakat kısa bir süre sonra dünyanın değişik bölgelerinden ampisiline ve diğer bazı antibiyotiklere karşı gittikçe artan oranda çoklu antibiyotik direnci geliştiği rapor edilmiştir (Bennish et al. 1992; Harnett, 1992; Voogd et al. 1992; Ashkenazi et al. 1995; Lima et al. 1995).

Shigella türlerinin tedavisinde çoklu antibiyotik direnci ile karşılaşmak gerek hekim gerek hasta gerekse risk grubundaki olası diğer hastalar için hoş olmayan bir

problemdir. Kocaeli ilinden örneklerle bizim yaptığımız çalışmada da birçok izolatta ampisilin (% 82), tetrasiklin (% 82), kloramfenikol (% 97,4), sulfometaksazol-trimetoprim (% 82) direnci saptadık. Bunların büyük çoğunluğunu *Shigella flexneri*'nin oluşturduğunu gördük. Çalışma alanımızda 32 izolatta ampisilin direnci saptadık (%82). *S. flexneri*, *S. sonnei*'ye göre ampisiline daha dirençli. Bu direncin sebebi özellikle TEM-1 ve SHV-1 gibi beta-laktamazları üretmeleridir. Ayrıca *Shigella* türleri pI>8 düşük düzeyli beta-laktamazları da üretirler ve bunlar kromozomal kökenli olup beta-laktam direnç oranına etki etmezler. Bu konu başka araştırmacılar tarafından da irdelenmiştir (Schumacher et al. 1992).

Genetik alandaki moleküler metodlarla yapılan çalışmalar ampisilin direncinin plazmid kökenli olduğunu göstermiştir (Brito-Alayon et al. 1994).

Ramirez ve arkadaşlarının 1994 yılında Camagucy Çocuk Hastanesinde yaptıkları çalışmada 40 *Shigella flexneri* izolatu elde edilmiş bunların 33 tanesinde (%82,5) yüksek konsantrasyonda (8-16 µg/mL) ampisilin direnci saptanmıştır, 7 tanesi ise 4 µg/mL 'de duyarlı bulunmuştur, ve hepsinin R (resistant) plazmidi taşıdığı yayında belirtilmiştir. (Ramirez et al.1994).

Brett tarafından Yeni Zellanda 'da yapılan çalışmada elde edilen *Shigella* izolatlarında antimikrobial direnç prevalansı elde edilmeye çalışılmıştır.20 hastane ve çevre laboratuvarlardan 1996 Ocak-Haziran arası elde edilen 107 *Shigella* izolatu agar dilisyon metodu ile test edilmiş ve bu izolatların %70' ini *Shigella sonnei* ve %23'ünü de *Shigella flexneri*'nin oluşturduğu görülmüştür. Ampisilin direnci %42 kotrimoksozal direnci %57 olarak saptanmış, ikisinin birlikte oluşturduğu kombine direnç ise tüm izolatların %30.8'inde görülmüştür. Ampisilin direncinin *S. sonnei*'den çok *S. flexneri* taşımaktadır(Brett, 1998).

Sonuç olarak; çalışmaya alınan 39 izolattan 32' sinde tespit edilen ampisilin direnci transkonjugasyon ile *E. coli*'ye aktarılabildi bu da yöremizde *Shigella* türlerinde önemli ölçüde direnç olduğunu ve bu direncin genetik kökeninin nakledilebilir genetik elemanlar olduğunu göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- AKMAN M., (1960). Ankara'da çocuklarda *Shigella* tipleri. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*. 3 :206.
- ASHKENAZİ S., MAY-ZAHOV M., DİNARİ G., GABBAY U., ZİLBERBERG R., SAMNA Z., (1993). Recent trends in the epidemiology of *Shigella* species in İsrail. *Clin Infect Dis*. 17 (5) : 897.
- ASHKENAZİ S., MAY-ZAHAV M., SULKES J., ZİLBERBERG R. & SAMRA Z., (1995). Increasing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Israel during the period 1984 to 1992. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39:819-823.
- AYSEV AD., UYSAL G., KUYUCU N., DOĞRU Ü., (1994). Çocuklarda *Shigella* enfeksiyonları . *MN Pediatriye Yönelişler*. 1 (3-4) :172.
- BENNİSH M. L., SALAM M. A., HOSSAİN M. A., MYAUX J., KHAN E. H.,
- CHAKRABORTY J., HENRY F. & RONSMANS C., (1992). Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983-1990: Increasing frequency of strains multiply resistance to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nalidixic acid. *Clin. Infect. Dis*. 14: 1055-1060.
- BİLGEHAN H., (1995). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci baskı. İzmir :Fakülteler Kitabevi :425-53.
- BRETT MS., (1998). Antimicrobial resistances among *Shigella* in New Zealand. *N Z Ma J*. 26; 111(1068):234-5
- BRİTO-ALAYON, N. E. , BLANDO, A. M. & MONZON-MORENO, C., (1994). Antibiotic resistance patterns and plazmid profiles for *Shigella* spp. isolated in Cordoba, Argentina. *J. Antimicrob. Chemother*. 34:253-249.
- BUSH K, JACOBY GA, MEDEİROS AA., (1995). A fuctional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molerculer structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 39 : 1211-33.
- BUTLER T., (1992) Shigellosis. In Wyngaarden JB., Smith LH., Bennet JC.eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 19th ed. Philadeiphia , WB Saunders Company. 1690.
- BÜKE A.Ç., KARAKARTAL G., TÜNGER A., KAMÇIOĞLU S., NAFİLE B., (1999). The prevalance and in vitro antimicrobial susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* in patients with diarrhea in the summer season, 1996-1998. *Turkish Journal of Infection* . 13(3):355-357.

- DANEL F., HALL LMC., GÜR D., LIVERMOOR dm., (1995). OXA-14, Another extended - spectrum variant of OXA -10 (PSE -2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob Agents Chemother.* 39 :1881-4.
- DUPONT HL., (1995). *Shigella* species (Bacillary dysentery). In : Mandell GL., Bennett JE., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 4th ed New York: Churchill Livingstone. 2033.
- EISENSTEIN BI., (1995). *Enterobacteriaceae* In : Mandell GL, Douglas RG., Bennet JE. (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 4th ed, New York : Churchill-Livingstone. 1964-80.
- GÜR D., (1996). b-Laktamazların Sınıflandırılması. *Flora.* 1 (2) : 80
- GÜR D., (1997). b-Laktamazlar. *Flora.* 3 Ek :3.
- HALE TL., (1991). Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol rev.* 55 (2) :206.
- HALL LMC., LIVERMOOR DM., GÜR D., AKOVA M., AKALIN HE., (1993). OXA-11 , an extended - spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37 :1637-44.
- HARNETT N., (1992). High level resistance to trimethoprim, cotrimoxazole and other antimicrobial agents among clinical isolates of *Shigella* species in Ontario, Canada-an update. *Epidemiol. Infect.* 109: 463-472.
- HORAN TC , WHITE JW, JARVIS WR, et al, Nosocomial Infection Surveillance, 1984.MMWR 1986 ;35 :1799-2988.
- ISENBERG HD., D'AMATO RF., (1998). Gram Negative Bacilli (*Enterobacteriaceae*). In :Gorbach SL., Bartlett JG., Blacklow NR. *Infectious Diseases.* 2nd end, Philadelphia , Pennsylvania :W.B. Saunders Company . 1783-96.
- JACOBY GA., ARCHER GL., (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Engl J Med* . 324: 601.
- KEUSCH GT., (1992). Shigellosis In. Gorbach SL., Bartlett JG., Blacklow NR., eds.*Infectious Diseases.* Philadelphia WB Saunders Company. 575.
- KEUSCH GT., BENNISH ML., (1991). Shigellosis In :Evans AS, Brachman PS, eds.*Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control.*2nd ed. New York : Plenum Medical book Company . 593.
- KONEMAN EW., ALLEN SD., JANDA WM., SCHRECKENBERGE., WASHINGTON CW Jr., (1992). *Diagnostic Microbiology* 4th ed. Philadelphia :JB

Lippincott Company. 105-84.

LIMA A. A. M., LIMA N. L., PINHO M. C. N., BARROS E. A. JR., TEIXEIRA M.J., MARTINS M. C. V. & GUERRANT R. L., (1995). High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:256-259.

MARAKI S., GEORGILADAKIS A., CHRISTIDOU A., SCOULICA E., TSELENTIS Y., (1998). Antimicrobial susceptibilities and beta-lactamase production of *Shigella* isolates in Crete, Greece, during the period 1991-1995. *MARAKI:APMIS*, Volume 106 (9). 879-883.

MAYER KH., OPAL SM., MEDEIROS AA., (1995). Mechanisms of Antibiotic Resistance. In :Mandell GL, Douglas RG., Bennet JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed, New York : Churchill-Livingstone. 212-25.

MURRAY BE., (1991). New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *J Infect Dis* . 163:1185.

NAVIA MM., CAPITANO L., RUIZ J., VARGAS M., URASSA H., SCHELLEMBERG D., GASCON J., VILA J., (1999). Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J Clin. Microbiol* . 37(10) : 3113-7.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Approved Standards 1999 ; M2-A6 and M7-A4.

NORDMANN P., (1998). Trends in beta-lactamase resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases*. 27 (Suppl 1) : S100-6. 26.

RAMIREZ MM., MARREROL M., MONTE RJ., MAESTRE JL., BRAVO L., (1994). Ampicillin resistance mediated by the R plasmid in strains of *Shigella flexneri*. *Rav Cuhano Mad Trop* . 46(3):148-51.

SCHUMACHER H., NIR M., MANSA B. & GRASSY A., (1992). [beta]-lactamases in *Shigella*. *APMIS* 100:954-956.

SÖYLETİR G., WILLKE A., (1996). Akut Bakteriyel İshaller. In: Willke A., Söyletir G., Doğanay M., eds. *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri . 605-606.

SUZUKI S., NAKAZAWA S. & USHIODA T., (1986). Yearly changes of drug resistance of *Shigella* strains isolated in Kyoto for five years from 1951. *Chemotherapy* . 4 : 336-340.

TESH VL, O'BRIEN AD., (1991). The pathogenic mechanism of Shiga toxin and the shiga like toxins. *Molecular Microbiol.* 5 (8) :1817.

VAHABOĞLU H., (1998). beta-Laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi. *Flora.* 3 (2) :73-9.

VAHABOĞLU MH., MÜLAZIMOĞLU L., ERDEM I., YILDIRIM I., TAŞER B., AVKAN V., (1993). Taksim Hastanesi'nde beta-lactam Antibiyotiklere karşı gelişen direncin sürveyansı. *Klinik Dergisi.* 6 (2):79-82.

VAHABOĞLU, H., DODANLI, S., EROĞLU, C., OZTURK, R., SOYLETİR, G., YILDIRIM, I., AND AVKAN, V. (1996). Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* stains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J.Clin.Microbiol.* 34:2942-2946

VAHABOĞLU H., ÖZTÜRK R., AYGÜN G., et al., (1997). Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey, a nation-wide multi-center study. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:2265-9.

VAHABOĞLU H., GÜNDEŞ S., KARADENİZLİ A., MUTLU B., ÇETİN S., KOLAYLI F., COŞKUNKAN F., DÜNDAR V., (2000). Transient Increase in Diarrheal Diseases after the Devastating Earthquake in Kocaeli, Turkey: Results of an Infectious Disease Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases.* 31:1386-1389.

VOOGD C. E., SCHOT C. S., VAN LEEUWEN W. J. & VAN KLİNGEREN B., (1992). Monitoring of antibiotic resistance in *Shigella* isolated in the Netherlands, 1984-1989. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:164-167.

WİLLKE A., ARMAN D., ÇOKCA F., SÜMERKAN B., SÖYLETİR G., BAKIR M., SIRMATEL F., LEBLEBİCİOĞLU H., KILIÇ S., (1999). Resistance of *Salmonella* and *Shigella* in Turkey. *Clinical Microbiology and Infection.*