

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI KLİNİK BAKTERİLERDEKİ BETA-LAKTAMAZLARIN JEL
ELEKTROFORETİK ANALİZİ**

SELDA KETEN BEDİR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI KLİNİK BAKTERİLERDEKİ BETA-LAKTAMAZLARIN JEL ELEKTROFORETİK ANALİZİ

Selda KETEN BEDİR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Bakteriyojoloji Laboratuvarı'ndan sağlanan 19 adet *Escherichia coli*, 9 adet *Klebsiella* spp. izolatu kullanıldı. Bu izolatların tamamı laboratuvarında uygulanan rutin antibiyogram testlerinde penisilin grubu antibiyotiklere orta derecede dirençli ve dirençli olan izolatlar arasından seçildi. Kültür ortamında, hücre ekstraktında ve poliakrilamid jel üzerinde beta-laktamaz enzim aktivitesi belirlendi. İncelenen izolatlardan 18 adet *E. coli* ve 7 adet *Klebsiella* spp. izolatının beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ve beta-laktam antibiyotiği içeren diskler ile yapılan antibiyogram sonucu klavulanik asitle inhibe olan beta-laktamaza sahip oldukları belirlendi. Sonikasyonla ekstrakte edilen beta-laktamaz aktivitesi Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez ile belirlendi ve 3 adet *E. coli* ve 3 adet *Klebsiella* spp.'daki beta laktamazların gruba özgül olarak farklı elektroforetik mobilitelere sahip oldukları görüldü.

2006, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: beta-laktamaz, *E. coli*, *Klebsiella* spp., antibiyotik dirençliliği

ABSTRACT

Master Thesis

GEL ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF BETA-LACTAMASES OF SOME CLINICAL BACTERIAL ISOLATES

SELDA KETEN BEDİR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

In this study, 19 isolates of *Escherichia coli* and 9 isolates of *Klebsiella* spp. obtained from Bacteriology Laboratory of Ibn-i Sina Hospital in Medical School of Ankara University were studied. All isolates were selected as resistant or moderately-resistant to penicillin by antibiotic susceptibility test applied routinely in the laboratory. Activity of beta-lactamase was detected in culture medium, cell extract and polyacrylamide gels. It has been shown that the 18 isolates of *E. coli* and 7 isolates of *Klebsiella* spp. had beta-lactamase enzyme, inhibited by clavulanic acid, by using the clavulanic acid and beta lactam antibiotic containing discs. The activity of beta-lactamase extracted by sonication was determined by native-polyacrylamide gel electrophoresis, and 3 isolates of *E. coli* and 3 isolates of *Klebsiella* spp. showed different enzymes having different electrophoretic mobilities specific to group.

2006, 42 pages

Key Words: beta-lactamase, *E. coli*, *Klebsiella* spp., antibiotic resistance

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Bakteriyoloji laboratuvarındaki çalışmalarımda bana yardımcı olan Biyolog Dr. Hüseyi POLAT'a,

Deneylerim esnasında teorik ve pratik bilgisinden çok faydalandığım Arş. Gör. Arzu ÇÖLERİ'ye,

Eğitim hayatımda bu aşamaya gelmemi sağlayan çok değerli aileme,

Varlığını, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiren, hayat arkadaşım eşim Sezgin BEDİR'e çok teşekkür ederim.

Selda KETEN BEDİR
ANKARA, EKİM 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Beta-Laktamazlar.....	3
2.2 Beta-Laktamazların Sınıflandırılması.....	6
2.3 Beta-Laktamazların Adlandırılması.....	10
2.4 Plazmidler ve Antibiyotik Direncindeki Rollerini.....	12
2.5 Beta-laktamazların Penisilin Bağlayan Proteinlerden Evrimi.....	13
2.6 Yeni Beta-laktamazların Seçiliminde Beta-laktamazların Etkisi.....	14
2.7 Geniş Spektrumlu Beta-laktamazlar.....	15
2.8 Beta-laktamaz İnhibitörleri.....	16
2.9 Beta-laktamaz Aktivitesinin Tespiti.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1 Materyaller.....	18
3.1.1 Bakteri izolatları.....	18
3.1.2 Besiyerleri ve kullanım amaçları.....	18
3.1.3 Solüsyonlar ve kullanım amaçları.....	19
3.2 Yöntemler.....	23
3.2.1 Kültür ortamında beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi.....	23
3.2.2 Bakterilerden beta-laktamaz ekstraksiyonu ve ekstraktta enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	23
3.2.3 Native- Poliakrilamid Jel Elektroferez.....	24
3.2.4 Poliakrilamid jelde beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi.....	24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	26

4.1	İzolatların Kültür Ortamında Beta-laktamaz Aktivitesi.....	26
4.2	Ekstrakta Enzim Aktivitesi.....	32
4.3	Poliakrilamid Jelde Beta-Laktamaz Aktivitesi.....	32
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
	KAYNAKLAR.....	38
	ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
ESBL	Geniş Spektrumlu Beta-laktamaz
g	Gram
IRT	İnhibitör Dirençli TEM
l	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
Native-PAGE	Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
V	Volt
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Beta-laktamların kimyasal yapıları (1-4), beta-laktamazların etki ettiği bölge (5).....	3
Şekil 2.2	Beta-laktamaz ailesinin üç boyutlu yapısı.....	4
Şekil 2.3	Beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 4.1	18205; <i>E. coli</i> , 18174; <i>E. coli</i> , 18512; <i>E. coli</i> , 19282; <i>E. coli</i> izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	27
Şekil 4.2	18530; <i>Klebsiella</i> spp, 18331; <i>E. coli</i> , 18811; <i>E. coli</i> , 18476; <i>Klebsiella</i> spp izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	27
Şekil 4.3	14180; <i>Klebsiella</i> spp, 14453; <i>E. coli</i> , 13181; <i>E. coli</i> , 13265; <i>E. coli</i> izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	28
Şekil 4.4	19276; <i>E. coli</i> , 19751; <i>E. coli</i> , 18960; <i>E. coli</i> , 19668; <i>E. coli</i> izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	28
Şekil 4.5	18476; <i>Klebsiella</i> spp, 18654; <i>Klebsiella</i> spp, 18183; <i>E. coli</i> , 19239; <i>Klebsiella</i> spp izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	29
Şekil 4.6	18510; <i>Klebsiella</i> spp, 18399; <i>E. coli</i> , 18385; <i>Klebsiella</i> spp; 18490; <i>E. coli</i> izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	29

Şekil 4.7	18175; <i>E. coli</i> , 19768; <i>E. coli</i> , 18908; <i>Klebsiella spp</i> , 18553; <i>E. coli</i> izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyoqram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC)).....	30
Şekil 4.8	1, 2; <i>E. coli</i> (18811)'in 18 saatlik kültür ekstraktının Native-PAG üzerindeki beta-laktamaz aktivitelemi.....	33
Şekil 4.9	1, 2; 19282 <i>E. coli</i> , 3, 4; 19751 <i>E. coli</i> , 5, 6; 19239 <i>Klebsiella</i> ın 18 saatlik kültür ekstraktlarının Native-PAG üzerindeki beta-laktamaz aktivitelemi.....	34
Şekil 4.10	1, 2, 3, 4; 19751: <i>E. coli</i> , 5, 6, 7, 8; 19239: <i>Klebsiella spp</i> . 18 ve 24 saatlik kültür ekstraktlarının Native-PAG üzerindeki beta-laktamaz aktivitelemi.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Ambler sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar	7
Çizelge 2.2	Beta-laktamazların karşılaştırmalı olarak sınıflandırılmaları (Aydemir 2005).....	11
Çizelge 4.1	<i>E. coli</i> ve <i>Klebsiella</i> izolatlarının Antibiyogram sonucu ölçülen zon çapları ve farkları.....	31

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar yeryüzünün en eski canlılarıdır. Bunun en önemli nedeni değişen koşullara hızla uyum sağlayabilme yetenekleridir. Bu yetenekleri sayesinde geliştirilen her yeni antibiyotikten kaçacak bir yol bulmaktadırlar. Sonuçta, enfeksiyonlarla savaşta en önemli engel teşkil eden antibiyotiklere direnç sorunu ortaya çıkmaktadır (Vahaboğlu 2004). Antibiyotiklere karşı gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek düzeyde çok önemli bir sorundur. Başta hastanelerde çoklu ilaç direncine sahip suşlarla gelişen hastane enfeksiyonları hastanede kalış süresini ve ölüm oranlarını arttırmakta ve oldukça fazla mali yük oluşturmaktadır. Artık günümüzde sadece nozokomiyal enfeksiyonlar değil toplumdaki enfeksiyonlarda da direnç önemli oranda artmakta, bu olay sorunu daha da büyütüp ciddi boyutlara taşımaktadır.

1928 yılında İsveçli araştırmacı Alexander Flemming'in penisilini keşfinden itibaren bu antibiyotik klinikte sıkça kullanılmaya başlandı. Ancak zamanla ciddi yan etkiler ve dirençli bakteri problemleri görülmeye başlandı. Penisilin molekülünde değişiklikler yapılarak doğal penisilinlere ek olarak, daha dar alanlarda daha başarılı yarı-sentetik penisilinler üretildi. Ancak penisilin molekülü değişikçe mikroorganizmalar karşı direnç geliştirmeyi sürdürdüler. Buna karşın araştırmacılar direnci kırarak maddeler üreterek mikroorganizmalara karşı geçici de olsa bir üstünlük sağlamayı başardılar. Altmış yılı aşkın bir süredir tıpta kullanılmakta olan penisilin bugün de, bütün doğal ve yarı-sentetik şekilleri ile, geniş bir mikroorganizma spektrumuna karşı başarı ile kullanılmaktadır. Bir yandan, bilinen antibiyotik gruplarının daha etkili türevleri tedavi alanına girerken, diğer yandan mikroorganizmaların değişik mekanizmalarla direnç geliştirmesi, yeni antibiyotiklerin bulunması veya geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir (Aktuğlu 1997).

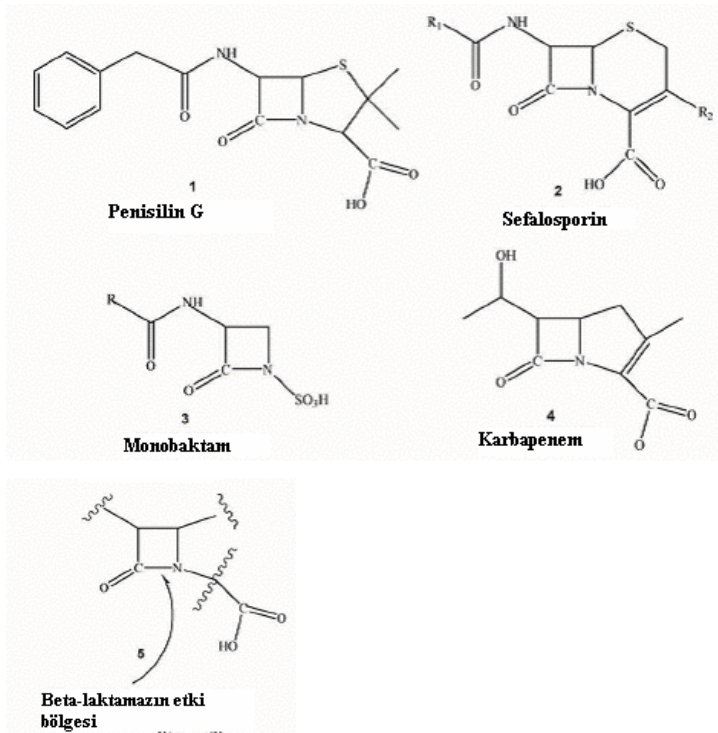
Değişik etki mekanizmaları gösteren antibiyotikler arasında bakteri hücre duvarı sentezini bozanlar beta laktam antibiyotikler olarak adlandırılırlar. Ortak özellikleri beta laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır. Bu halkaya bağlanan farklı halka ve yan zincirlerle farklı özelliklere sahip değişik grup beta laktam antibiyotikleri elde edilir (Özsoy 2001). Beta laktam antibiyotiklerin çoğuna karşı ortaya çıkan dirençten ise beta-laktamazlar sorumludur. Penisilin bağlayan protein (PBP)'lerden türediği düşünülen bu enzimler penisilin, sefalosporin, monobaktam ve karbapenem grubu antibakteriyellerin beta laktam halkalarını hidrolize ederek antibiyotiği etkisiz hale getirirler. Beta-laktamazların, yarı sentetik beta laktam ilaçlar klinik kullanıma girmeden önce de doğada var olduğu bilinmekte ve canlıların beta-laktamazları ekolojik ortamlarını koruma amacıyla ürettiği sanılmaktadır. Günümüzde, büyük olasılıkla beta laktam içeren ilaçların kullanımının artışına bağlı olarak çok çeşitli yeni beta-laktamazlar saptanmaya devam etmektedir. Antibiyotiklere dirençli bakteri salgınlığının genellikle ya yeni bir sınıf beta laktam ilacın kullanıma girmesine, ya da bir ilacın aşırı kullanımına bağlı olduğu belirlenmiştir. Yeni beta-laktamazlar sürekli saptanmaya devam etmektedir ve sayıları 530'u bulmuştur (Bush 2006).

Bu araştırmada, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi, Bakteriyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp.'lerinin beta-laktamaz aktiviteleri kültür ortamında, hücre ekstraktında ve poliakrilamid jel üzerinde belirlenerek elektroforetik mobilite yönünden enzim farklılıklarının olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Beta-Laktamazlar

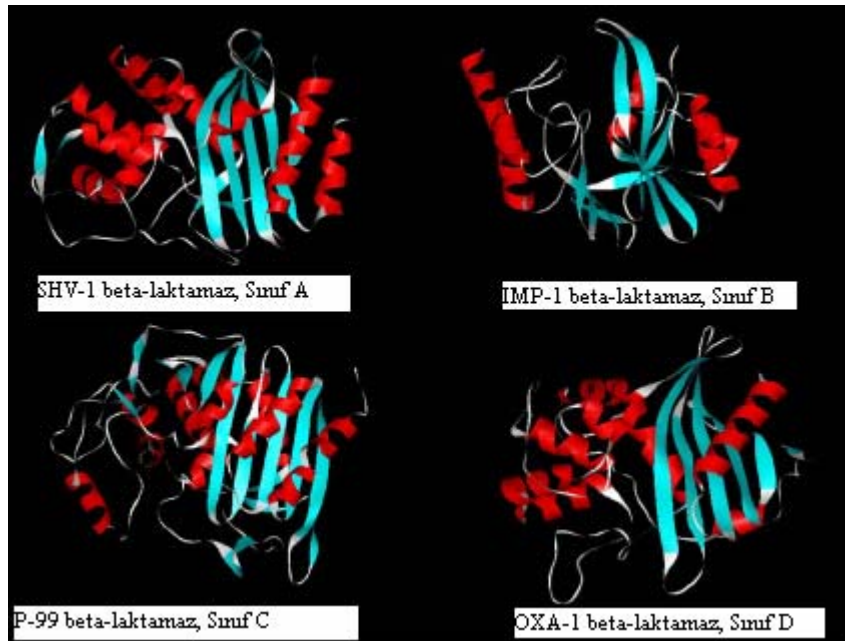
Beta-laktamazlar, beta laktam antibiyotiklerdeki beta laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir (Nicolas and Chanoine 1996). Giriş kısmında da belirtildiği gibi beta laktam antibiyotiklerin ortak özellikleri beta laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır. Şekil 2.1’de de görüldüğü gibi bu halkaya bağlanan farklı halka ve yan zincirlerle farklı özelliklere sahip değişik grup beta laktam antibiyotikleri elde edilir (Özsoy 2001).



Şekil 2.1 Beta laktamların kimyasal yapıları (1-4), beta-laktamazların etki ettiği bölge (5)

Beta laktam antibiyotiklere direnç esas olarak beta-laktamaz üretimine bağlıdır. Beta-laktamazları kodlayan genler, bakteri kromozomlarında, plazmidlerde veya transpozonlarda yerleşmiş olabilirler. Son yıllarda pek çok *bla* geni (beta-laktamaz geni) integronlar üzerinde tanımlanmışlardır (Weldhagen 2004).

Beta-laktamazlar aktif bölgelerinde ya bir serin kökü (Ambler sınıf A, C, D) veya bir metal iyonu (Zn^{+2}) (Ambler sınıf B) taşırlar ki bunlar beta laktam halkasındaki amid bağına bağlanıp hidrolize olmasını sağlar. Beta-laktamazlar, beta laktam antibiyotiğini hidrolize edip, antibiyotiğin hedefi olan penisilin bağlayan proteinlere (PBP'ler) ulaşmadan önce inaktive olmasını sağlarlar (Massova and Mobashery 1998). Beta-laktamazların üç boyutlu yapıları Şekil 2.2'de belirtilmiştir.



Şekil 2.2 Beta-laktamazların üç boyutlu yapıları

Beta-laktamaz enzimi ilk kez 1928 yılında Fleming tarafından fark edilmiştir. Bu araştırmacı bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığını gözlemlemiş, 1940'da Abraham ve Chain, *E. coli*'den izole ettikleri ekstraktın penisilin etkisini

ortadan kaldırdığını göstermişler ve elde ettikleri bu enzime ‘penisilinaz’ adını vermişlerdir. 1940’larda Kirby, uygun disk duyarlılık testlerini geliştirdikten sonra 1944 yılında stafilokokların penisiline duyarlı ve dirençli suşlarını karşılaştırdığında penisiline dirençli olanlarda bu enzimin bulunduğunu saptamış ve stafilokokların bu enzimi parçalayabildiğini göstermiştir. 1947’lere gelindiğinde hastaneden izole edilen stafilokok suşlarının büyük çoğunluğu penisilinlere karşı dirençli hale gelmiştir. 1959’da Beecham tarafından 6-aminopenisilolik asitten yarısentetik penisilinlerin sentezlenmesi büyük avantaj sağlanmıştır. Yarı-sentetik penisilinler metisilin ve ampisilin, sefalosporinlerden sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesiyle dikkatler gram negatif bakterilerin beta-laktamazları üzerine çevrilmiştir (Aydemir 2005). 1960’lara gelindiğinde beta-laktamaz ile ilgili çalışmalar, hastane infeksiyonlarından izole edilen *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilerden, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* gibi gram negatif enterik patojenlere kaymıştır. Bu bakteriler başlangıçta ampisilinle inhibe edilmelerine rağmen, çok geçmeden cerrahi servislerde ampisiline dirençli *Klebsiella* suşlarının varlığı bildirilmiştir. 1960’ların sonlarında ampisilin ve diğer aminopenisilinlere karşı *E. coli*’nin direnç geliştirmesi hastane infeksiyonlarında büyük bir problem olmaya başlamıştır (Aydemir 2005).

Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından 530’a yakın beta-laktamaz tanımlanmıştır (Bush 2006, in press). Son zamanlarda, beta-laktamazlar arasında en büyük ilgiyi, geniş spektrumlu beta-laktamazlar, inhibitör dirençli beta-laktamazlar ve karbapenemazlar çekmektedir. *E. coli* ve *Klebsiella* spp.da, seftazidim, sefotaksim ve sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençten Geniş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (ESBL’ler) sorumludur. Bundan dolayı, ESBL’ler beta laktam ile tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır. Endişe verici olan, toplumdaki hastalardan izole edilen patojenler arasında ESBL üretenlerin sayısının giderek artmasıdır.

2.2 Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Gram negatif bakteriler, gram pozitiflerden daha fazla çeşitte beta-laktamaz üretirler. Bu çeşitlilik birkaç sınıflandırma şemasının oluşmasına yol açmıştır (Opal *et al.* 2000).

1940 yılında Abraham ve Chain'in bildirdikleri penisilinazla birlikte beta-laktamazların ilk sınıflandırması yapılmıştır. Sykes ve Richmond 1973 yılında yaptıkları sınıflandırmada o güne dek bilinen tüm gram negatif bakteri beta-laktamazlarını substrat profillerine göre 5 grupta toplamışlardır. Daha sonra 1976'da Sykes ve Matthew beta-laktamazları izoelektrik noktalarına göre sınıflandırmışlardır (Bush 1989, Aydemir 2005). Moleküler yapıyla ilgili sınıflandırma ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından yapılmış, grup C sefalosporinazlar 1981'de Jourin ve Grundstrom tarafından tanımlanmıştır. Oksasilini hidrolize eden grup D enzimler 1980'lerin sonunda diğer serin enzimlerinden ayrılmıştır (Gür 1996).

Aydemir'in (2005) bildirdiğine göre; beta-laktamazlar moleküler yapılarına ya da substrat ve inhibitör profilleri ile belirlenen işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır (Opal *et al.* 2000). Bunlar içinde en önemli kriterlerden biri substrat profilleri olmuştur. Substrat profili enzimin çeşitli beta laktam antibiyotikleri hidroliz etme aktivitesini göstermektedir (Bush 1989).

Ambler, beta-laktamazları aminoasit ve nükleotid dizilerine (moleküler yapısı), Sykes-Richmond izoelektrik noktalarına , Bush ise biyokimyasal özelliklerine göre (substrat profilleri) sınıflandırmıştır. Aminoasit ve nükleotid sıralama çalışmaları esas alınarak 4 moleküler sınıf belirlenmiştir.

Grup A: Bu grup beta-laktamazların 29000 dalton civarında molekül ağırlıkları vardır, aktif bölgelerinde serin rezidüsü taşırlar ve tercihen öncelikle penisilinleri hidroliz

ederler. Örnek olarak gram negatif basillerde yaygın olan TEM1 beta-laktamaz verilebilir.

Grup B: Beta-laktamaz aktivitesi için gerekli olan çinko bağlayıcı tiol grubuna sahip metalloenzimlerdir..

Grup C: *E. coli* K12'nin kromozomal ampC geni tarafından belirlenen beta-laktamızı içerir. Bu, *Shigella* ve *Klebsiella* spp.'nin kromozom aracılı beta-laktamızıyla homoloji gösterir. Bu enzimler esas olarak sefalosporinaz aktivitesi gösteren, moleküler ağırlığı 39000 dalton civarında olan büyük proteinlerdir. Aktif bölgesinde serin aktivitesine sahiptirler ancak sınıf A beta-laktamazlarla az miktarda homoloji gösterirler (Opal *et al.* 2000).

Grup D: Oksasilini hidrolize eden enzimlerdir. Ambler'in sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar ve bu enzimleri ürettiği bilinen organizmalar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Ambler sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar

Ambler sınıfı	Beta-laktamaz	Organizma
A	TEM-1 SHV-1 PCI	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
B	IMP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	AmpC P99	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
D	OXA-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması 1995 yılında yapılan Bush Medeiros Jacoby sınıflandırmasıdır. Bu sınıflandırma beta-laktamazların substrat profili ve klavulonik asitle inhibisyonuna göre yapılmıştır (Opal *et al.* 2000, Özsoy 2001).

Buna göre enzimler 4 grupta toplanmıştır. Bu sınıflandırmada substrat profili, beta-laktamazların sınıflandırılması ve tanımlanması için kullanılan birinci parametredir ve enzimin çeşitli beta laktam antibiyotikleri hidroliz etme aktivitesini göstermektedir. Birçok beta-laktamaz için tek bir yüksek substrat konsantrasyonunda saptanan rölatif hidroliz hızı verilmekte, penisilinazlar için referans olarak penisilin, sefalosporinazlar için ise sefaloridin kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada olduğu gibi substrat özgüllüğü ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığın temel alındığı fenotipik sınıflandırmada tüm enzimlerin sınıflandırılmış olması ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyogram ile ilişki kurulabilmesi gibi avantajlar sağlamasına karşın, bir tek nokta mutasyonu ile substrat özgüllüğü değişebilmektedir.

Bush sınıflandırmasında;

Grup 1 beta-laktamazlar; klavulonik asitle inhibe olmayan sefalosporinazlardır ve kromozomaldır. Yüksek düzeyde enzim üreten mutantlara rastlanmakla beraber genellikle indüklenbilir enzimler şeklindedir. Sefaloridin ve sefalotini penisilinlerden daha hızlı hidrolize eder. Sulbaktam ve klavulonik asitten etkilenmezler. Aztreonam ve kloksasilin ile güçlü bir şekilde inhibe olurlar. Moleküler sınıf C'ye uyarlar. İzoelektrik noktaları yedinin üzerindedir (Gür 1996).

Grup 2a beta-laktamazlar; penisilini hidrolize eden, klavulonik asite duyarlı enzimlerdir. *Staphylococcus aureus*'un enzimleri bu gruptandır. Ayrıca *Bacillus cereus*'un kromozomal beta-laktamazları da bu gruptandır.

Grup 2b beta-laktamazlar; penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize eder, klavulonik asitle inhibe olurlar. Plazmid kontrolündeki TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu grupta yer alır. Yeni kuşak sefalosporinler , aztreonam ve iminepeme karşı düşük hidrolitik aktivite göstermektedirler.

Grup 2be; sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi oksimino beta-laktamları hidrolize eden geniş spektrumlu beta-laktamazları içerir, klavulonik asitle güçlü bir şekilde inhibe olurlar. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir, ilk kez Türk izolatlarında izole edilmiştir.

Grup 2br; klavulonik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazları içerir (Gür 1996).

Grup 2c; klavulonik asitle genellikle inhibe olur ve kloksasilin veya aztreonama zayıf afinite gösterir, moleküler sınıf A'ya girer (Bush 1989).

Grup 2d; kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazları içerir. OXA enzimleri (OXA14'den OXA 22'ye kadar) bu gruptadır. OXA 11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta tanımlanmıştır. Klavulonik asit ve sulbaktama dirençli enzimlerdir.

Grup 2e; klavulonik asitle inhibe edilen sefalosporinazları içerir.

Grup 2f; karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulonik asitle inhibe olmaktadır (Gür 1996).

Grup 3; enzimatik aktiviteleri için metal iyonlara gereksinim duyan ve klavulonik asitle inhibe olmayan enzimleri içerir. Moleküler sınıf B'ye uyar. EDTA ile inhibe olan enzimlerdir (Gür 1996).

Grup 4; klavulonik asitle inhibe olmayan çeşitli penisilinazları içerir. Molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir (Gür 1996).

Çizelge 2.2'de beta-laktamazların karşılaştırmalı olarak sınıflandırılmalarını tablo halinde görebiliriz.

2.3 Beta-Laktamazların Adlandırılmaları

Beta-laktamazların adlandırılmasındaki farklı yaklaşımlar bu enzimleri gördüklerinden daha karmaşık hale getirmiştir. Bu enzimler tercih ettikleri substratlara (CARB, FUR, IMP, OXA), biyokimyasal özelliklerine (SHV, NBC), genlerine (Amp, Cep A), izole edildikleri bakterilere (AER, PSE), suşlara (P 99), hasta isimlerine (TEM, ROB), hastaneye (MIR, RHH), eyaletlere (OHIO), bulan kişiye (HMS) göre isim almışlardır. Ancak bazıları geçerliliklerini yitirmişlerdir. Örneğin; SHV-1 sülfidril 'variable' dan (değişken) kısaltılmıştır, buna karşın artık SHV-1 enziminin aktif bölgesinin sülfidril olmadığı, serin hidroksil olduğu anlaşılmıştır. Son yıllarda büyük bir hızla artmakta olan Tem enzimlerinden türeyen enzimlere ise CAZ (seftazidimaz), CTX (sefotaksimaz) veya IRT (inhibitör rezistan) gibi tanımlayıcı isimler verilmiş ve bu da karmaşaya yol açmıştır. Bu konuda önerilen ise TEM'den köken alan tüm enzimlerin TEM 2b, TEM 43 gibi numara ile belirlenmesidir (Aydemir 2005).

Çizelge 2.2 Beta-laktamazların karşılaştırmalı olarak sınıflandırılmaları (Aydemir 2005)

Bush Jacoby Medeiros	Sykes ve Richmond	Molekül sınıfı	Tercih edilen substrat	İnhibisyon Klavulonat	İnhibisyon EDTA	Temsilci enzimler
1	Ia,Ib,Id	C	SS	-	-	Gram (-)'lerin kromozomal ve plazmid kökenli Amp C enzimleri (MIR-1, BIL-1, MOX-1, ACT-1, LAT-1..2,FOX1..3,CMY-1..5)
2a		A	P	+	-	Gram(-)'lerin penicilinazları; NPS-1(P1), <i>Staphylococcus aureus</i> (P1) <i>Bacillus cereus</i> 569 (Kr)
2b	III	A	P,SS,M	+	-	TEM-1 (P1), TEM-2 (Kr), SHV-1 (P1-Kr)

2be	IV (sadeceK1)	A	P,K	+	-	TEM-3..29(P1) TEM-42, 43, 47, 48, 49, 50, 52, 60, 61 (P1), SHV- 2..12(P1), K-1 (Kr)
2br		A	P	+	-	TEM-30..41, 44, 45, 51, 59
2c	II,IV	A	P,K	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, HMS-1, ROB-1, OHIO-1, LXA-1, SAR-1, TLE-1, BRO-1
2d	V	D	P,K1	+	-	OXA-1-21 (P1), PSE (P1)
2e	Ie	A	S	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f		A	P,S,K	-	-	<i>Enterobacter cloaca</i> 'nın NMC-A ve <i>Serratia spp</i> 'nin Sme-I enzimi
3		B	K,B	-	+	<i>Xanthomonas maltophilia</i> 'nin L1 ve <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CerA enzimi
4		?	P	-	?	<i>Pseudomonas cepecia</i> 'nın penisilinazları

SS: setalosporinler, P: Penisilinler, K: Karbenisilin, KI: Kloksasilin, B: Beta laktamlar,
Pl: Plazmid kaynaklı, Kr: Kromozomal kaynaklı

2.4 Plazmidler ve Antibiyotik Direncindeki Rollerini

Plazmidler, bakteri hücresinin kromozom dışında sitoplazmada yer alan halka yapısında DNA parçalarıdır. Plazmidlerin taşıdığı genetik şifre bakterinin bakterinin yaşaması için mutlak gerekli değildir. Ancak plazmidler antibiyotik direnci gibi bakteriye çevre koşullarına dayanmada üstünlük sağlayabilecek bazı özellikler kazandırabilir. Bir plazmid üzerinde birden fazla antibiyotik grubuna karşı direnç sağlayacak genetik şifre taşınabilir. Plazmidler bir bakteriden diğerine transfer edilebilirler. Bu sayede plazmid aracılığıyla sağlanan direnç kolayca bakteriler arasında yayılabilmektedir (Özsoy 2001).

Plazmidler aracılığıyla sentezlenen beta-laktamazlar endişe sebebidir, çünkü; beta-laktamaz genlerinin plazmid ve transpozonlar üzerinde yer alması demek, bir grup bakteride yer alan bu enzimlerin yakın zamanda veya daha sonra diğer gruplarda da görüleceği anlamını taşır. Antibiyotiklerin yaygın biçimde kullanılması dirençli organizmaların lokal olarak artmasına yol açar (Opal *et al.* 2000).

Plazmid aracılığıyla sentezlenen beta-laktamazlara örnek olarak başta *E. coli* olmak üzere tüm gram negatif bakterilerde sık olarak bulunan TEM-1, TEM-2 ve esas olarak da *Klebsiella* suşları tarafından sentezlenen SHV-1 enzimi verilebilir. Bu enzimler ampisilin, mezlosilin, piperasilin gibi geniş spektrumlu olanları dahil tüm penisilinlere ve 1. kuşak sefalosporinlere karşı direnç sağlar. Ancak 3. kuşak sefalosporinler, aztreonam ve beta-laktamaz inhibitörleri (sulbaktam, klavulonat, tazobaktam) tarafından kolayca inhibe edilirler. Bu enzimleri fazla miktarda sentezleyen mutantlar ise ek olarak 2. kuşak sefalosporinlere ve beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktamlara da dirençli hale gelirler. OXA grubu beta-laktamazlaroksasilin ve benzeri penisilinleri, PSE grubu ise karbenisilini inaktive eder. Bu enzimler özellikle *P. aeruginosa*'da ve başta *E. coli* olmak üzere enterik gram negatif bakterilerde bulunurlar. Beta-laktamaz inhibitörleri bu enzimleri de kolayca inaktive ederler (Aydemir 2005).

TEM ve SHV tipi enzim taşıyan bazı bakteriler bu enzimleri sentezleyen plazmidlerini çoğaltarak enzim miktarını arttırabilirler. Fazla miktarda salgılanan enzim bu durumda sadece penisilin türevlerine değil, daha önceden bakterinin duyarlı olduğu beta-laktam+beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları ve 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere karşı da direnç gelişmesine yol açar. Karbapenem türevleri bu türden direnç taşıyan bakterilere karşı etkilidirler (Aydemir 2005).

2.5 Beta-laktamazların Penisilin Bağlayan Proteinlerden Evrimi

Bakteri hücre duvarı, çapraz bağlı peptidoglikanlardan oluşmuş kompleks bir yapıya sahiptir. Gram (-) bakterilerde, çapraz bağlanma Di-Amino Pimelik asidin (DAP) amino grubu ile, terminal D-Alanin'in karboksil grubu arasında oluşur. Bakteri

transpeptidazları (Penisilin Bağlayan Proteinler) bu çapraz bağlanma basamağını katalizleyen enzimlerdir. Beta-laktamlar, N-Asetil Muramik Asit'e bağlanan pentapeptidin sondan bir önceki D-Ala-D-Ala birimine benzerlik gösterir. Bu benzerlikten dolayı PBP'ler hücre duvarı sentezi için yanlışlıkla penisilini substrat olarak kullanırlar. Penisiline bağlanan transpeptidaz aktivasyonunu kaybeder ve hücre duvarı sentezinin sonraki basamakları engellenmiş olur. Beta-laktamazlar PBP'lere yapıcı benzediklerinden, bu enzimin PBP'lerden köken aldığı düşünülmektedir. Beta-laktamazlar Gram (-) bakterilerin periplazmalarında bulunurlar ve genellikle Gram (+) bakterilerce ortama salınırlar. PBP'ler ise stoplazmik membranda yerleşmişlerdir ve hücre duvarı sentezi tamamlandığında hücrenin dış yüzü boyunca yayılmış halde bulunurlar.

PBP'ler, beta-laktamazlara göre daha büyük enzimlerdir. Büyük molekül ağırlıkları ile PBP'ler 'çok fonksiyonlu enzimler' şeklinde tanımlanırlar. Genellikle 40.000'in altında molekül ağırlığına sahip beta-laktamazlar ise basit fonksiyonludurlar. Hidrolize edilen beta-laktamdan ayrılan asilatlanmış serinlerin oranı da bu iki enzim grubunun karakterizasyonunda ayırım yapılabilecek diğer bir özelliktir. PBP'ler bakterinin gelişmesi için gerekli olan enzimlerken, beta-laktamazlar organizmayı beta-laktamlara karşı korumak için oluşurlar. PBP'lerin doğal substratı bakteri hücre duvarı sentezi için kullanılan olgunlaşmamış peptidoglikan yapısıdır (nascent peptidoglycan strand). Bazı araştırmalar beta-laktamaz ailesi enzimlerinin başka rollere sahip olduklarını iddia etse de, beta-laktamazların doğal substratı beta-laktamlardır. Beta-laktamazların, antibiyotikleri inaktive edip, savunmasız bakteriyi olası tehlikelerden korumak için, PBP'lerden köken aldıkları genel bir inanıştır. Bu basit evrim, organizma için aslında hücre duvarı sentezinde gerekli olan PBP'lerin alternatifi olması açısından bir avantajdır.

Doğal beta-laktam antibiyotikleri üreten organizmalar beta-laktamaz üreten organizmalar ile aynı ortamlarda bulunurlar. Bu çevresel nişler, beta-laktam antibiyotiklerin ikincil metabolitler olarak salgılandığı rutubetli ve verimli topraklar

olabilir. Beta-laktam içeren ajanları doğal olarak üreten bakteriler aynı zamanda beta-laktamaz da üretebilirler (Bush 2000).

2.6 Yeni Beta-laktamazların Seçiliminde Beta-laktamların Etkisi

Penisilinin klinikte kullanılmaya başlandığı ilk 10 yıl süresince 2 büyük grup beta-laktamaz tanımlanmıştır. Antibakteriyel aktiviteyi imha edebilen ilk enzim, bugün *E. coli* olarak adlandırdığımız bakteriden izole edildi. Bu enzimin, tüm Enterobakter türlerinde bulunan plazmid kaynaklı TEM-1 mi, yoksa kromozomal AmpC sefalosporinaz mı olduğu tam kesin değildir. Çünkü orijinal kültür tekrar spesifik olarak tanımlanamamıştır. İkinci set beta-laktamazlar ise, sınıf A penisilinazlardır ve streptokok ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde penisilin kullanımının artması sonucu, 1940'ların sonunda ortaya çıkmıştır. Tüm stafilokoklar aslında ilk başta penisiline hassas olmalarına rağmen, 1942'de penisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'lar tanımlanmaya başladı. 1948'de İngiltere'de bir hastane ellerindeki *S. aureus* izolatlarının %59'unun penisilinaz enzimine bağlı olarak penisilin dirençli olduğunu bildirmiştir. Stafilokoklardaki penisilinazlar, tedavide engelleyici etkiye sahip ilk beta-laktamazlardır. Bu enzimler, hidrolitik aktivitede dar bir spektruma sahiptir, basit penisilinleri kolayca hidrolize edebilirken, sefalosporinlerin hidrolizinde zayıftırlar (Zygmunt *et al.* 1992, Bush 2000). Aynı penisilinaz *Enterococcus faecalis*'te de tanımlanmıştır ancak henüz streptokoklarda bu enzime rastlanmamıştır (Bush 2005).

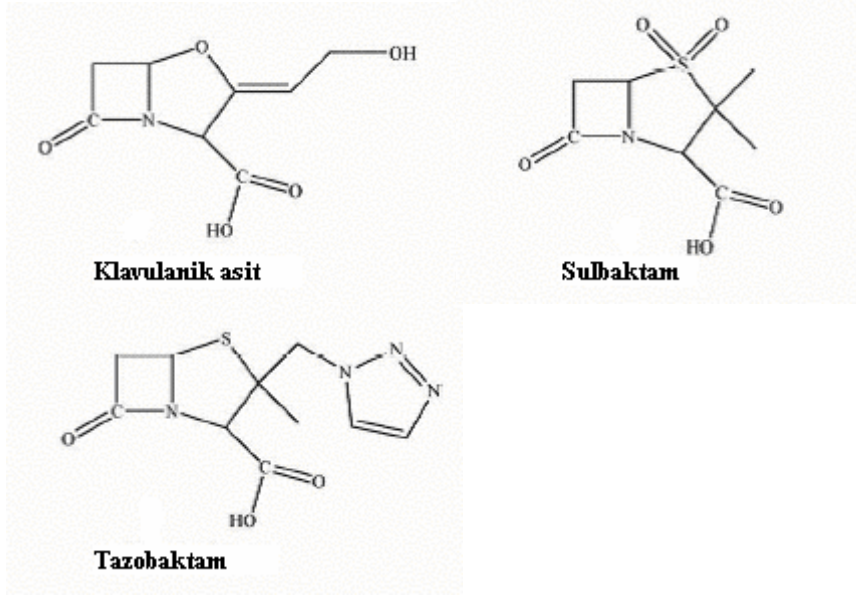
2.7 Geniş Spektrumlu Beta-laktamazlar

Daha etkili ve daha geniş spektrumlu ajanlar geliştirildikçe, özellikle Gram (-) bakterilerden çok çeşitli beta-laktamazlar tanımlanmaya başlandı. Geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL) ise 3. kuşak sefalosporinlerin üretiminden çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmışlar ve dünya genelinde dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli* salgınlarının başlıca sebebi olmuşlardır. Veriler incelendiğinde ESBL'lerin ortaya

çıkması ile seftazidin ve sefotaksim gibi ajanların aşırı kullanımının bağlantılı olduğu görülmüştür. ESBL'ler ilk tanımlandıklarında, TEM ve SHV gibi plazmid kaynaklı beta-laktamazların bir varyantı olarak bildirilmelerine rağmen, bugün Türkiye'de PER-1 varyantı olan, batı Avrupa'da ise CTX-M varyantı olan pek çok ESBL bulunmaktadır (Bauernfeind *et al.* 1996, Vahaboğlu vd. 1997, Gazouli *et al.* 1998, Palucha *et al.* 1999, Bush 2000). ESBL'ler ayrıca OXA beta-laktamazlardan türemiş enzimleri de içerirler (Grup 2d beta-laktamazlar). Bu enzimler, isoksazolil penisilinleri de geniş spektrumlu sefalosporinler kadar iyi hidrolize edebilirler. Böyle bir enzim Türkiye'den izole edilen bir *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmıştır (Danel *et al.* 1995, Philippon *et al.* 1997, Naas *et al.* 1998, Danel *et al.* 1998, Bush 2000).

2.8 Beta-laktamaz İnhibitörleri

1970'lerde, *Streptomyces clavuligerus*'dan bir beta-laktam (klavam) izole edildi. Kendi başına çok az bir antibakteriyel etki gösteren bu beta-laktam, başka bir beta-laktam ile birlikte kombine edildiğinde (örneğin; ampisilin), ampisilin dirençli *E. coli*, *K. Pneumoniae* ve *H. influenza*'nın ampisilin için Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu'nu (MIC) düşürmeye yardımcı olur. Bu bileşik, klinikte en sık kullanılan beta-laktamaz inhibitörlerinin (klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam) geliştirilmesine öncü olmuştur. Şekil 2.3'de beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları görülmektedir.



Şekil 2.3 Beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları

Bu üç beta-laktamaz inhibitörü, beta-laktamlar gibi davranırlar. Beta-laktamazların aktif bölgelerine bağlanırlar ancak kolaylıkla hidrolize olmazlar. Beta-laktamaz inhibitörleri, bir partner beta-laktam antibiyotiği ile birlikte kullanılmalıdır. Bu şekilde antibiyotiği enzimatik hidrolizden korurlar. Klinikte kullanılan beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörleri şöyledir; AugmentinTM (klavulanik asit+amoksilin), UnasynTM(sulbaktam+ampisilin), TimentinTM (klavulanat+tisarsilin) ve ZosinTM (tazobaktam+piperasilin). Sefoperozon+sulbaktam kombinasyonu ise klinikte kullanılan tek sefalosporin ve beta-laktamaz inhibitörü ikilisidir.

İnhibitör dirençli beta-laktamazlar ilk kez 1990'larda keşfedilmeye başlandı (Blazquez et al. 1993). TEM-1 beta-laktamazlarının bir varyantı olarak bulunan bu enzim İnhibitör-Dirençli TEM ('Inhibitor-Resistance TEMs', IRTs) olarak adlandırılmışlardır ve Bush sınıflandırılmasında Grup 2br'ye denk gelmektedir. İlk yıllarda pek çok IRT *E. coli*'lerde tanımlanırken, sonraları *Klebsiella*, *Proteus* ve *Citrobacter* spp. türlerinde de tanımlanmaya başlamıştır ve inhibitör-dirençli SHV'ler olarak adlandırılmıştır (Prinakaris et al. 1997, Dubois et al. 2004).

2.9 Beta-laktamaz Aktivitesinin Tespiti

Beta-laktamazların tespiti ve karakterizasyonu tedavide kullanılacak uygun antibiyotiği belirlemede büyük önem taşımaktadır (Eftekhar and Rafiee 2005). Bakteri tarafında beta-laktamaz üretiminin tespit edilebilmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur (iyodometrik, asidimetrik, kromojenik, inhibisyon vs.) (Hodge *et al.* 1978, Oberhofer and Towle 1982, Livermore 1995, Llanes *et al.* 2003). İzoelektrik fokuslama beta-laktamazları, jel üzerindeki aktivitelerini kromojenik bir substrat emdirilmiş filtre kağıdı kullanılarak göstermek suretiyle ayırır (Mathew *et al.* 1975). Benzer bir metod da jel üzerinde enzim aktivitesinin bir beta-laktam antibiyotik ve nişasta-iyot kullanarak gösterilmesidir (Liu *et al.* 1998). Tai ve arkadaşlarının (1985) önerdiği yöntemde ise sodyum dodesil sülfat jel elektroforezinde (SDS_PAGE) beta-laktamaz enzimi yine nişasta-iyot emdirilmiş filtre kağıdı kullanarak görüntülenebilmektedir (Liang *et al.* 2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyaller

3.1.1 Bakteri izolatları

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen ve penisilin grubu antibiyotiklere dirençli veya orta derecede dirençli olarak tanımlanmış 19adet *E. coli* ve 9 adet *Klebsiella* spp. izolatu kullanıldı.

3.1.2 Besiyerleri ve kullanım amaçları

Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid) (pH 6.0)

Pepton	10 g/l
Laktoz	10 g/l
Dipotasyum hidrojen fosfat	20 g/l
Eosin Y	0.4 g/l
Metilen mavisi	0.06 g/l
Agar no:3	15 g/l

Stokdan alınan bakterileri aktiveştirmek amacıyla kullanıldı.

L-Broth (pH 7.4)

Tripton	30 g
Yeast ekstraktı	15 g
NaCl	15 g

2700 ml distile su içerisinde karıştırılarak çözüldü. 1N NaOH kullanılarak pH 7.4'e ayarlandı. Distile su ile 3 litreye tamamlandı ve çalkalandı. Tüplere dağıtılıp 121°C'de 20 dk sterilize edildi. Bu besi yeri bakteri izolatlarını çoğaltmak için kullanıldı.

Nutrient Agar (pH 6.8)

Pancreatic digest of gelatin	5.0 g/l
Beef ekstraktı	3.0 g/l
Agar	15 g/l

Eritilen besi yeri tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika sterilize edildi, tüpler yatık vaziyette bırakılarak katılaşmaları sağlandı. Bu besi yeri bakterileri saklamak amacıyla kullanıldı.

3.1.3 Solüsyonlar ve kullanım amaçları

0.05 M KPO₄ (Potasyum Fosfat Tamponu) (pH 7.0)

0.05 M K₂HPO₄ ve 0.05 M KH₂PO₄ hazırlanarak pH'ları ölçüldü. Hazırlanan bu iki tampon pH 7.0 oluşturacak şekilde karıştırıldı ve KPO₄ tamponu elde edildi. Bakteri peletlerinin yıkanması amacıyla kullanıldı.

I₂ (iyot) solüsyonu

1.25 M KI içinde 0.25 M I₂ hazırlandı ve karanlıkta saklandı.

Nişasta solüsyonu:

Kullanılmadan hemen önce çözülebilir nişasta (Merck) distile su içerisinde %2 oranında kaynatılarak çözüldü.

0.005 M KPO₄ (Potasyum Fosfat Tamponu)(pH 6.0)

0.005 M K₂HPO₄ ve 0.005 M KH₂PO₄ hazırlanarak pH'ları ölçüldü. Hazırlanan bu iki tampon pH 6.0 oluşturacak şekilde karıştırıldı ve KPO₄ tamponu elde edildi. Elektroforez sonrası jelin pH'sının dengelenmesi amacıyla kullanıldı.

Penisilin solüsyonu

0.8 g benzil penisilin (Ulagay), 10 ml 0.005 M Fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözüldü. Beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanıldı.

Nişasta-İyot Kağıdı

Hazırlanan I₂ solüsyonu %2'lik nişasta çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek Whatmann no:1 filtre kağıdı bu solüsyona daldırıldı ve çıkarıldı. Karanlık, serin ve kuru bir ortamda kurutularak saklandı. Jelde enzim aktivitesinin görüntülenmesi aşamasında kullanıldı.

Elektroforez solüsyonları

Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi, (%30)

Akrilamid 28.8 g

Bisakrilamid 1.2 g

Maddeler damıtık suda çözülerek hacim 100ml'ye tamamlandı ve filtre kağıdından süzülen çözelti koyu renkli şişede +4°C'de saklandı.

1.5 M Tris-HCl, pH:8.6

Trizma-Base 18.165 g

75 ml distile su içerisinde çözüldü. HCl ile pH 8.6'ya ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

0.5 M Tris-HCl, pH:6.8

Trizma-Base 6.05 g

75 ml distile su içerisinde çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

APS (%10)

Amonyum persülfat 0.1 g/ml

Damıtık suda hazırlanıp buzdolabında en fazla 1 hafta saklandı veya taze olarak kullanıldı.

TEMED

Hazır solusyonu kullanıldı.

Koşturma tamponu (elektrot tamponu), pH:8.3

Trizma-Base 1.331 g

Glisin 6.336 g

Distile su 1100 ml

Örnek tamponu

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.56 ml

Gliserol 4 ml

Bromofenol mavisi(toz) ½ spatül ucu

Distile su 3.5 ml

Ayırıcı jel (%12)

Akrilamid/Bisakrilamid(%30) 6.94 ml

Distile su 5.97 ml

1.5 M Tris-HCl, pH:8.6 4.33 ml

APS 86.7 µl

TEMED 8.16 µl

Yığma jeli (%4)

Akrilamid/Bisakrilamid(%30)	0.82 ml
Distile su	2.93 ml
0.5 M Tris-HCl.pH:6.8	1.25 ml
APS	30 µl
TEMED	5µl

3.2 Yöntemler

3.2.1 Kültür ortamında beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi

E. coli ve *Klebsiella spp.* izolatları EMB besi yerinde 37°C'de 24 saat süreyle geliştirildi. Besiyerinden alınan bakteri örneği steril serum fizyolojik içinde süspansiyon edilerek Mc Farland No:5' e göre yoğunluğu ayarlandı. Steril eküvyon kullanılarak Müller Hinton besi yerine yayma ekim yapıldı. Her izolat için sefotaksim içeren bir antibiyotik diski ile sefotaksim ve klavulanik asidi bir arada içeren bir başka antibiyotik diski kullanıldı. Diskler yerleştirildikten sonra petriyeler 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (Dandekar *et al.* 2004).

3.2.2 Bakterilerden beta-laktamaz ekstraksiyonu ve ekstraktta enzim aktivitesinin belirlenmesi

Antibiyoqram sonrası, beta-laktamaz (+) olarak belirlenen bakterilerden enzim eldesi için Xiong ve arkadaşları (2004) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bakteriler, L-broth besi yerine ekildi ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edildi. Bir

gece boyunca üretilen bakteriler, ertesi gün taze L-broth ile 1/20 oranında seyreltilerek 37°C'deki çalkalamalı inkübatöre geç logaritmik faza kadar tekrar üretildi (yaklaşık 18 saat). İzolatların her birinden 10 ml alındı, soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak peletler 3 ml 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkandı. Elde edilen peletler aynı tamponun 3 ml'si içinde süspanse edildi. Ultrasonik parçalayıcı ile (Hielscher UP 200H) sonikasyon yapıldı. Her bir örnek 0.5 cycle, 60 Amplitude ile ortalama 30 dakika sonike edildi. 3-5 dakika aralıklarla faz-kontrast mikroskobu ile canlı hücre sayısındaki azalma kontrol edildi. Görüntü alanında canlı hücrelerin sayılabilecek kadar azaldığı aşamada sonikasyona son verildi. Sonikasyon sonrası tüm örnekler +4°C'de 15 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant +4°C'de saklandı ve beta-laktamaz kaynağı olarak kullanıldı..

Süpernatanttaki enzim aktivitesinin belirlenmesi için Skinner ve Wise'in (1977) önerdiği iyodometrik yöntem kullanıldı. Mikrosantrifüj tüpüne, 0.05 M Fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde 10000 IU/ml yoğunlukta çözülmüş benzil penisilinden 0.5 ml kondu. Üzerine enzim ekstraktından 0.5 ml eklenerek 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. 2 saatin sonunda her tüpe 2 damla %2'lik nişasta solüsyonu ve hemen ardından 1 damla iyot damlatıldı. Maviden şeffafa doğru giden renk değişimi enzim aktivitesinin varlığını gösterdi.

3.2.3 Native- Poliakrilamid Jel Elektroforez

Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapıldı. 20x20cm boyutlarındaki dikey jel sisteminde, etanol ile yıkanıp kurutularak temizlenen cam plakaların arasına önce 0.7mm kalınlıkta %12'lik ayırıcı jel döküldü ve üzeri su ile doyurulmuş izobütanol ile kaplandı. Polimerizasyondan sonra izobütanol çözeltisi distile su ile yıkandı ve bunun üzerine tarak yerleştirilerek %4'lük yükleme jeli döküldü. Yükleme jelinin polimerizasyonu sonrasında tarak çıkarıldı ve kuyucuklar temizlendi. Spot test ile konsantrasyonları yarı kantitatif olarak belirlenen örneklerden yaklaşık eşit miktarlarda kuyucuklara yüklendi. Yükleme jeli

için 25 mA (185 V) ve ayırıcı jel için 35 mA (255 V) elektrik akımı uygulandı. Örneklerin yürütülmesi işleminin tamamlanmasının ardından, jel cam plakalar arasından çıkarılarak 0.005 M Potasyum Fosfat (pH 6.0) yıkama tamponuna bırakıldı.

3.2.4 Poliakrilamid jelde beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi

Elektroforez sonrası poliakrilamid jelde enzim aktivitesinin belirlenmesi Tai ve arkadaşlarının (1984) önerdiği yöntem kullanılarak yapıldı. Cam plakalar arasından çıkarılan jel 200 ml 0.005 M KPO₄ (pH 6.0) tamponu içerisinde, oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. 30 dakika sonra tampon değiştirildi ve 30 dakika daha çalkalandı. Daha sonra tampon tekrar değiştirilerek jel 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. 40. dakikada tampon değiştirerek toplam 80 dakika inkübe edildi. Tampondan çıkarılan jel temiz bir cam plaka üzerine yerleştirildi. Jelin üzerine penisilin emdirilmiş Whatmann no:1 filtre kağıdı yerleştirilerek, diğer bir cam plaka ile üzeri kapatıldı ve hafifçe bastırıldı. 8-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda üstteki cam plaka ile filtre kağıdı kaldırıldı. Bir gece önceden hazırlanıp kurutulan nişasta-iyot solusyonu emdirilmiş Whatmann filtre kağıdı jelin üzerine kondu. 2. cam plaka tekrar kapatıldı ve jel ters çevrilerek renk değişimleri gözlemlendi.

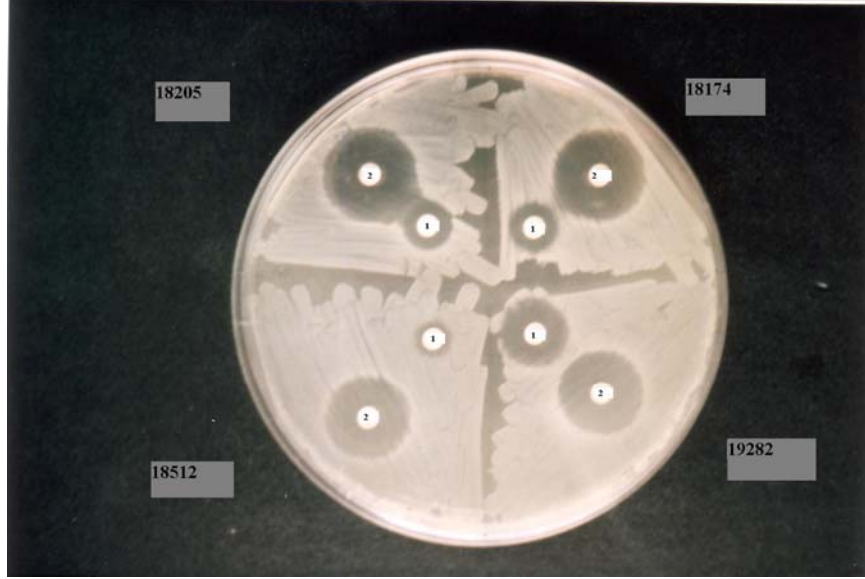
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bakteri Kültür Ortamında Beta-laktamaz Aktivitesi

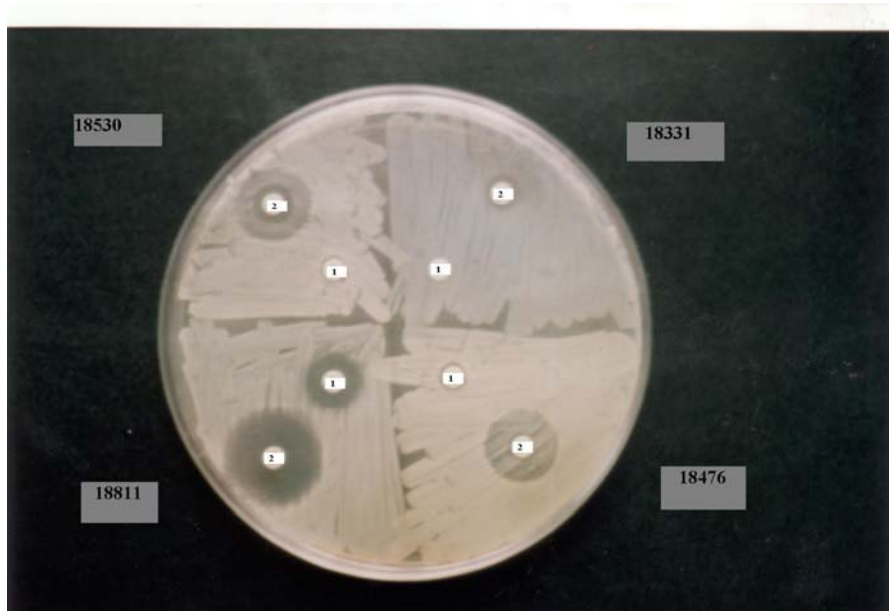
Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Bakteriyoloji laboratuvarında izole edilmiş olan *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşları kullanıldı. Bu suşlar rutin antibiyogram testleri sonucu penisilin grubu antibiyotiklere karşı dirençli ve orta derecede dirençli olarak bildirilen ve tip tayinleri bu laboratuvarında yapılmış olan izolatlardır.

Kültür ortamında enzim aktivitesini göstermek için inhibisyon yöntemi kullanıldı. Müler Hinton agar besiyeri yerine ekilen bakterilerin üzerine bir adet seftazidim (CAZ) ve bir adet seftazidim+klavulanik (CZC) asit içeren antibiyotik diskleri yerleştirildi. Beta-laktamaz üreten izolatlar penisilini hidrolize edebildiklerinden sadece antibiyotik içeren disklerinin etrafında, büyük boyutlarda zonlar gözlenmedi. Buna karşın antibiyotiğin yanı sıra bir beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit içeren disklerin etrafında, sadece antibiyotik içerenlere oranla daha büyük boyutlarda zonlar gözlendi (Şekil 4.1 - 4.7). Zonlar arasındaki farkın 4 mm ve daha büyük olması durumunda

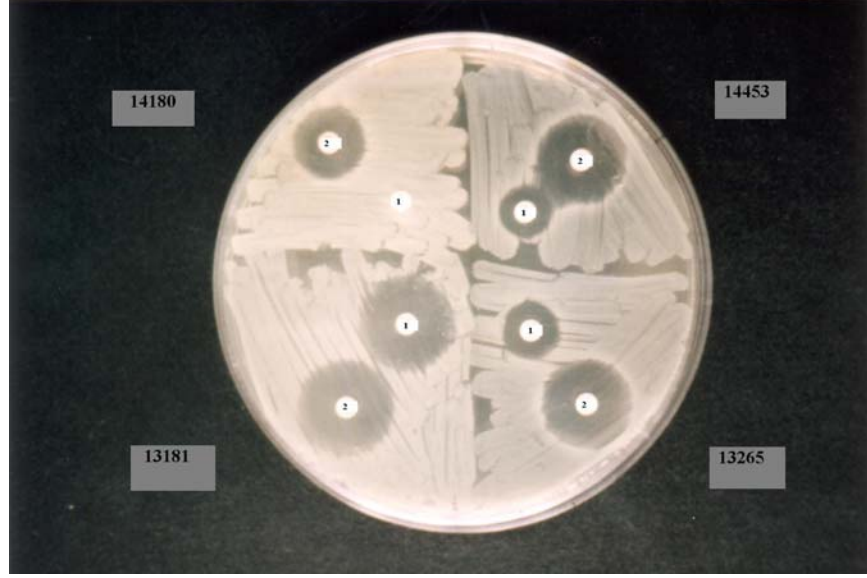
izolat beta-laktamaz pozitif olarak deęerlendirildi (Çizelge 4.1). Bu şekilde sonuç veren bakterilerin klavulanik asitle inhibe olabilen bir beta-laktamaz sentezlediđini söyleyebiliriz.



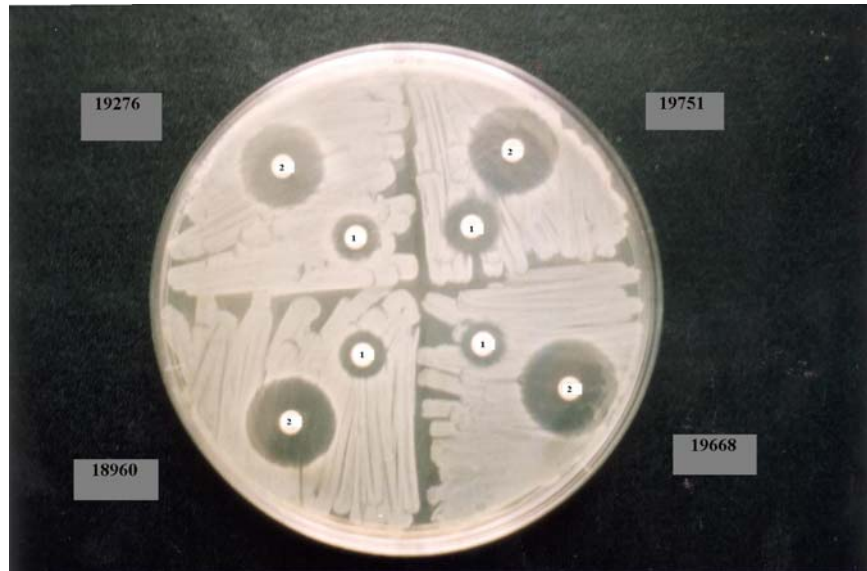
Şekil 4.1 18205; *E. coli*, 18174; *E. coli*, 18512; *E. coli*, 19282; *E. coli* izolatlarının Mùler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))



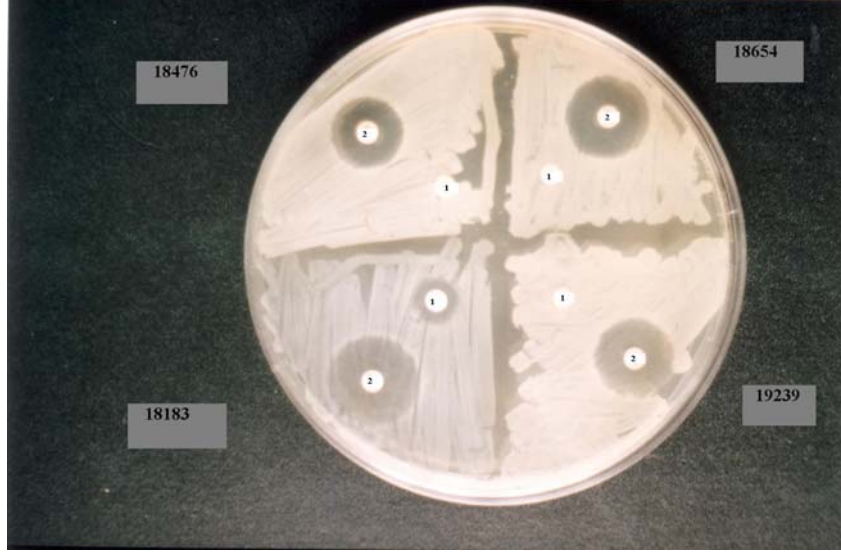
Şekil 4.2 18530; *Klebsiella* spp, 18331; *E. coli*, 18811; *E. coli*, 18476; *Klebsiella* spp izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))



Şekil 4.3 14180; *Klebsiella* spp, 14453; *E. coli*, 13181; *E. coli*, 13265; *E. coli* izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))



Şekil 4.4 19276; *E. coli*, 19751; *E. coli*, 18960; *E. coli*, 19668; *E. coli* izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))

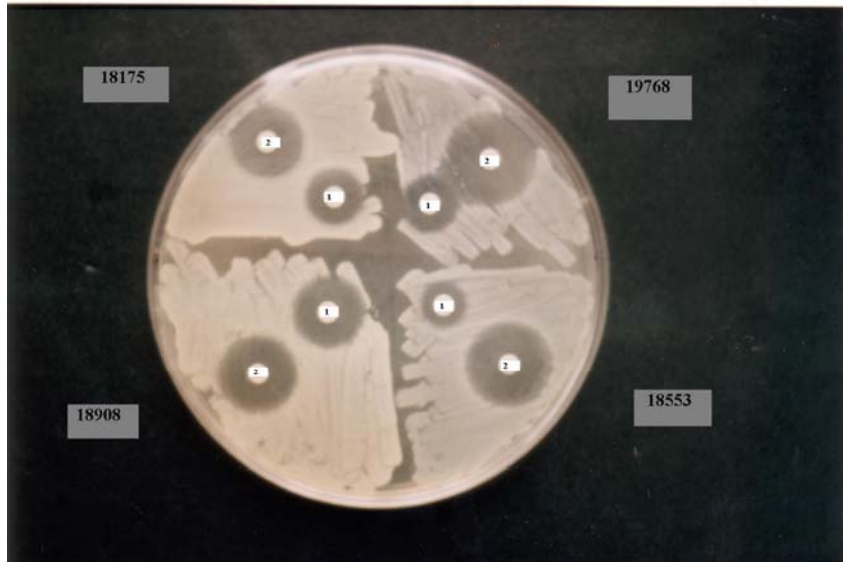


Şekil 4.5 18476; *Klebsiella spp*, 18654; *Klebsiella spp*, 18183; *E. coli*, 19239; *Klebsiella spp* izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))



Şekil 4.6 18510; *Klebsiella spp*, 18399; *E. coli*, 18385; *Klebsiella spp*; 18490; *E. coli* izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram

sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))



Şekil 4.7 18175; *E. coli*, 19768; *E. coli*, 18908; *Klebsiella spp*, 18553; *E. coli* izolatlarının Müler Hinton besi yerinde 24 saat sonraki antibiyogram sonuçları (1; Sefotaksim antibiyotik diski (CAZ), 2; Sefotaksim+klavulonik asit (CZC))

Çizelge 4.1 Antibiyogram sonucu ölçülen zon çapları ve farkları.

No	Bakteri	CZC (mm)	CAZ (mm)	Fark (mm)	ESBL
18175	<i>E. coli</i>	24	20	4	+
19768	<i>E. coli</i>	30	20	10	+
18553	<i>E. coli</i>	26	14	12	+
19282	<i>E. coli</i>	24	20	4	+
18512	<i>E. coli</i>	24	10	14	+
18174	<i>E. coli</i>	28	14	14	+
18205	<i>E. coli</i>	28	14	14	+
18331	<i>E. coli</i>	10	6	4	+
18811	<i>E. coli</i>	30	18	12	+
13265	<i>E. coli</i>	26	16	10	+
13181	<i>E. coli</i>	28	26	2	-
14453	<i>E. coli</i>	26	14	12	+
19276	<i>E. coli</i>	24	14	10	+
19751	<i>E. coli</i>	26	16	10	+
18960	<i>E. coli</i>	26	14	12	+
19668	<i>E. coli</i>	28	14	14	+
18183	<i>E. coli</i>	26	12	14	+
18399	<i>E. coli</i>	28	12	16	+
18490	<i>E. coli</i>	28	14	14	+
18908	<i>Klebsiella</i> spp.	26	24	2	-
18530	<i>Klebsiella</i> spp.	22	8	14	+
18476	<i>Klebsiella</i> spp.	22	8	14	+
14180	<i>Klebsiella</i> spp.	22	6	18	+
19239	<i>Klebsiella</i> spp.	26	6	20	+
18654	<i>Klebsiella</i> spp.	24	6	18	+
18476	<i>Klebsiella</i> spp.	22	8	14	+
18510	<i>Klebsiella</i> spp.	24	8	16	+

18385	<i>Klebsiella spp.</i>	28	28	0	-
-------	------------------------	----	----	---	---

4.2 Ekstraktta Enzim Aktivitesi

İnhibisyon testi sonucu beta-laktamaz (+) olarak belirlenen *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarından 6 tanesinin sonikasyon sonucu elde edilen ekstraktında aktivasyon bakıldı. Örnekler penisilin ile 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma nişasta solüsyonu ardından damlatılan iyot solüsyonu mavi bir renk oluşturdu. Penisilini parçalayan tüm izolatlarda renk çok kısa bir sürede kaybolurken negatif kontrolde değişmeden kaldı.

Bu çalışmada enzim aktivitesi, Skinner ve Wise'in (1977) önerdiği iyodometrik yöntem uygulanarak belirlendi. Teste tabi tutulan ekstraktlardaki beta-laktamaz enzimi penisilini parçalayarak penisiloik asit ortaya çıkmasına neden olur. Penisiloik asit ortam pH'ını düşürdüğünden I₂ redüklenir (indirgenir). Redüklenen I₂ bağlı bulunduğu nişastadan ayrılır ve nişasta-iyot kompleksinin oluşturduğu mavi renk kaybolur (Citri 1964).

4.3 Poliakrilamid Jelde Beta-laktamaz Aktivitesi

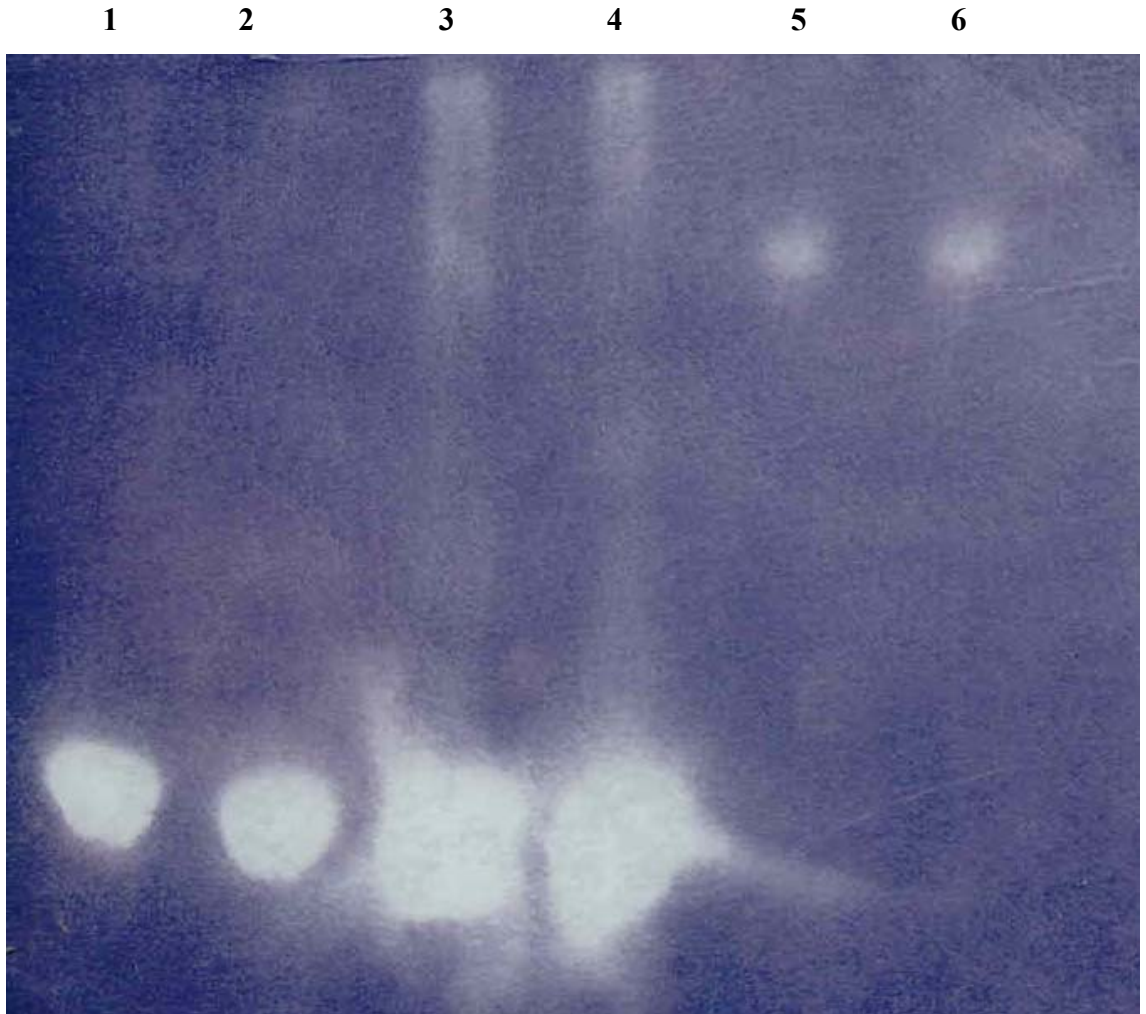
Poliakrilamid jelde beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi ekstraktta uygulanan yöntem ile benzerlik göstermektedir. Jel üzerine penisilin emdirilmiş filtre kağıdı yerleştirildiği süre içinde beta-laktamaz içeren bölgelerde enzim penisilini parçalayarak penisiloik asit ortaya çıkmasına neden olmuştur. Penisiloik asit ortam pH'ını düşürdüğünden I₂ redüklenir (indirgenir). Redüklenen I₂ bağlı bulunduğu nişastadan ayrılır ve nişasta-iyot kompleksinin oluşturduğu mavi renk kaybolur (Citri 1964, Tai *et al.* 1984).

Şekil 4.8 'de 18811 örnek numaralı *E. coli*'nin beta-laktamaz bandı görülmektedir. Şekil 4.9'da ise iki adet *E. coli* (19282, 19751) ve bir adet *Klebsiella* spp. izolatının beta-laktamaz bantları görülmektedir. Şekil incelendiğinde *E. coli* izolatlarının elektroforetik mobilitelerinin *Klebsiella* spp.'ya oranda daha fazla olduğu görülmektedir. İki *E. coli* izolatının enzim bantları jelin alt kısmına yakın yer alırken, *Klebsiella* spp.'nın enzim bandı daha az ilerleyerek jelin üst kısmına yakın yerleşmiştir. Bu durumda, *E. coli* izolatlarının ürettikleri enzimlerin negatif (-) yüklerinin *Klebsiella* spp. izolatlarına oranla fazla olduğu söylenebilir.



Şekil 4.8 1, 2; *E. coli* (18811)'in 18 saatlik kültür ekstraktının Native-PAG üzerindeki beta-laktamaz aktiviteleri

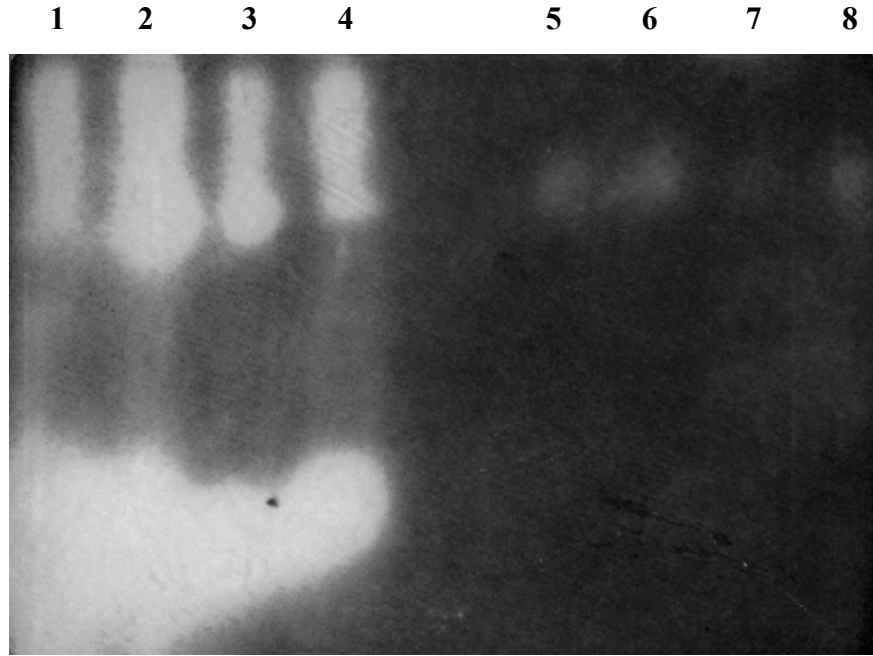
Jelde enzim bantlarının görülme süresi bakteriden bakteriye farklılık göstermiştir. Bu durum hücre ekstraktlarındaki enzim miktarının farklı olmasına veya enzimin aktivitesine bağlı olabilir. Büyük miktardaki enzim daha fazla antibiyotiği hidrolize edebildiğinden ortam pH'sının düşmesi ve mavi rengin açılması daha çabuk gerçekleşmektedir. Süre ilerledikçe yeni bantlar görülmeye başlanırken, ilk görülen bantların alanı genişlemekte ve koyu mavi zemin üzerindeki şeffaflık yayılmaktadır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 1, 2; 19282 *E. coli*, 3, 4; 19751 *E. coli*, 5, 6; 19239 *Klebsiella* m 18 saatlik kültür ekstraktlarının Native-PAG üzerindeki beta-laktamaz aktiviteleri

Şekil 4.9'da 19751 örnek numaralı *E. coli* izolatının enzim bandı (3 ve 4 numaralı bantlar), nişasta-iyotlu filtre kağıdı jel üzerine yerleştirildikten sonra birkaç dakika içerisinde görünür hale gelmiştir. İkinci olarak 19282 numaralı *E. coli*'nin enzim bandı (1 ve 2 numaralı bantlar) görünür hale gelmiştir. Bu süre içerisinde ilk görülen bantların alanı genişlemeye başlamıştır. Filtre kağıdının jel üzerine yerleştirilmesinden yaklaşık 30 dakika sonra 19239 numaralı *Klebsiella* spp. izolatının bandı (5 ve 6 numaralı bantlar) görülmüştür. Şekil 4.9'daki jel görüntüsü bu süreden sonra alınmıştır. Şekilde de görüldüğü gibi, ilk belirlenen 19751 numaralı *E. coli*'nin enzim bandı, son bandın görüldüğü dakikada alanını genişletmiş ve koyu mavi zemim üzerindeki şeffaflığı oldukça yayılmıştır.

Jel üzerine nişasta-iyotlu filtre kağıdının yerleştirilmesinden yaklaşık 2 saat (120 dakika) sonra 19751 örnek numaralı *E. coli* izolatında ilk gözlenenenden farklı bir bant daha gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 1, 2, 3, 4; 19751: *E. coli*, 5, 6, 7, 8; 19239: *Klebsiella* spp. 18 ve 24 saatlik kültür ekstraktlarının Native-PAGE üzerindeki beta-laktamaz aktiviteleri

Şekil 4.10'da görülen jelde, 19751 numaralı *E. coli* ve 19239 numaralı *Klebsiella* spp. izolatlarının 18 ve 24 saatlik kültürlerinin ekstraktları yürütüldü. 19751 numaralı *E. coli*'nin 18 saatlik kültür ekstraktı 1 ve 2 numaralı bantları verirken, 24 saatlik kültür ekstraktı 3 ve 4 numaralı bantları verdi. 19239 numaralı *Klebsiella* spp.'nin 18 saatlik kültür ekstraktı 5 ve 6 numaralı bantları verirken, 24 saatlik kültür ekstraktı 7 ve 8 numaralı bantları verdi. Her iki izolatta da 18 saatlik kültür ekstraktlarının enzim bantları 24 saatlik ekstraktların bantlarına oranla daha erken gözlenebildi. Bu durum bize, bakterilerin 18 saatlik kültürlerinin daha fazla miktarda enzim içerdiğini veya 18 saatteki enzim aktivitelerinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, Şekil 4.10'da 19751 örnek numaralı *E. coli* izolatının *Klebsiella* spp. ile aynı hizada bir başka enziminin daha olduğu görülmektedir. Bu izolatta birbirinden farklı elektroforetik mobilitelere sahip iki enzim vardır. Bu enzimlerde biri daha fazla negatif (-) yük taşıdığından jelde daha fazla ilerlemiştir, diğeri ise *Klebsiella* spp. izolatlarının enzim bantları ile aynı hizada yerleşmiştir. Bu da bize, *E. coli*'nin ikinci enzimi ile *Klebsiella* spp.'nin enziminin aynı negatif (-) yüke sahip olduklarını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, penisilin grubu antibiyotiklere dirençli ve orta derecede dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* izolatlarında beta-laktamaz enziminin dirençten sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu enzimin incelenen bakteri gruplarında farklı elektroforetik mobilitelere sahip olduğu ve enzimlerin farklı miktarlarda bulunduğu gözlenmiştir. İleride daha fazla sayıda bakteri ile çalışılarak, beta-laktamaz enziminin gruplar arasında dağılımı ve aktivasyonu konusunda daha ayrıntılı bilgilere ulaşılabacaktır.

KAYNAKLAR

- Aktuğlu, Y. 1997. Pratikte antibiyotik kullanımı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul. 11-25.
- Aydemir, H. 2005. *E. coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında GSBL araştırılması. Ankara Dışkapı Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık tezi.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. and Casellas, J.M. 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40; 509-513.
- Blazquez, J., Baquero, M.R., Canton, R., Alos, I. And Baquero, F. 1993. Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistance to clavulanate, sulbactam and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49; 4210-4219.
- Bush, K. 1989. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 33; 259-263.
- Bush, K. 2000. Beta-laktamazları evrimi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 34; 7-21.
- Citri, N. 1964. *Methods Med. Res.* 10; 221-232.
- Dandekar, P.K., Tetreault, J., Quinn, J. P., Nightingale, C. H. and Nicoulau, D. P. 2004. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase Producing *E. coli* and *Klebsiella* isolates in a large community teaching hospital in Connecticut. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49; 37-39.
- Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D. and Livermore, D.M. 1995. OXA-14, another extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39; 1881-1884.

- Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D. and Livermore, D.M. 1998. OXA-16, further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42; 3117-3122.
- Nordmann, P. and Quentin, C. 2004. SHV-49, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48; 4466-4469.
- Eftkhar, F. and Rafiee, R. 2005. An overlay gel method for identification and isolation of bacterial beta-lactamases. *Journal of Microbiological Methods*, Article in press.
- Gazouli, M., Tzelepi, E., Marcogiannakis, A. and Legakis, N.J. 1998. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *S. Typhimurium*. *FEMS Microbiol. Ltr.* 165; 289-293.
- Gür, D. 1996. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi*, 1; 80-86.
- Hodge, W., Ciak, J. and Tramont, E.C. 1978. Simple method for detection of penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.*, 7;102-103.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685.
- Liang, W., Huang, H., Lin, R.D. and Hou, W.C. 2003. Screening for natural inhibitors of penicillinase by copolymerization of hydrolyzed starch<or glycogen in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels for detecting penicillinase activity. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44; 187-191.
- Liu, P.K.E., Tung, J.C., Ke, S.C. and Chen, S.L. 1998. Molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district Hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 36(9); 2759-2762.
- Livermore, D. M. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8; 557-584.
- Llanes, R., Gonzales, M., Martinez, I., Sosa, J., Guzman, D., Gutierrez, O., Llop, A. and Sanches, L. 2003. Evaluation of four methods for detecting the beta-lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98(8); 1089-1091.

- Mathew, M., Haris, A.M., Marshal, M.J. and Ross, G.W. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *Journal of General Microbiology*, 88; 169-178.
- Naas, T., Sougakoff, T.W., Casetta, A. and Nordmann, P. 1998. Molecular characterization of OXA-20 a novel class D beta-lactamase and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42; 2074-2083.
- Massova, I. and Mobashery, S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42; 1-17.
- Nicolas-Chanoine, M.H. 1996. Impact of beta-lactamases on the clinical use of beta-lactams antibiotics. *Int. Antimicrob. Agents*, 7; 21-26.
- Oberhofer, T.R. and Towle, D.W. 1982. Evaluation of the rapid strip test for detection of beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, 15; 777-782.
- Opal, S.M., Mayer, K.H. and Medeiros, A.A. 2000. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Pennsylvania, Fifth edition; 243-249.
- Özsoy, F. 2001. GSBL: Klinik Önemi ve Getirdiği Sorunlar. *Flora dergisi*, 6 (Ek 1); 3-21.
- Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W. and Gniadkowski, M. 1999. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44(4); 489-499.
- Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A.T., Barakett, V. and Nordmann, P. 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41(October); 2188-2195.
- Prinakaris, E.E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M. and Tzouveleki, L. S. 1997. Emergence of an inhibitor-resistance beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother.*, 41; 838-840.

- Skinner, A. and Wise, R. 1977. A comparison of three rapid methods for the detection of beta-lactamase activity in *Haemophilus influenzae*. Journal of Clinical Pathology, 30; 1030-1032.
- Tai, P.C., Zyk, N. and Citri, N. 1984. In Situ Detection of Beta-lactamase Activity in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry, 144; 199-203.
- Vahaboğlu, H. 2004. Antibiyotiklerde direnç sorunu. Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel, 2; 92-96.
- Xiong, Z., Zhu, D., Wang, F., Zhang, Y., Okamoto, R. and Inoue, M. 2003. A *Klebsiella pneumoniae* producing three kinds of class A beta-lactamases encoded by one single plasmid isolated from a patient in Huashan Hospital, Shanghai, China. International Journal of Antimicrobial Agents, 23; 262-267.
- Zygmunt, D.J., Stratton, C. W. and Kernodle, D.S.1992. Characterization of four beta-lactamase produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother, 36; 440-445.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selda KETEN BEDİR

Doğum Yeri: Müllheim/ ALMANYA

Doğum Tarihi: 03.06.1981

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bilecik Anadolu Lisesi (1999)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1999-2003)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2003-2006)