

Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında Beta-Laktamaz ve Kinolon Direnç Genlerinin Araştırılması

Investigation of Beta-Lactamases and Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*

Gül BAYRAM¹, Nuran DELİALİOĞLU², Gürol EMEKDAŞ², Candan ÖZTÜRK², Mehmet Sami SERİN³

¹ Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri, Mersin, Türkiye

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

³ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

ÖZET

Giriş: Klebsiella türleri ve Escherichia coli başta olmak üzere, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılımı tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Çalışmada, GSBL pozitif E. coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarının, beta-laktamaz ve kinolon direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya, GSBL pozitif 108 E. coli ve 23 K. pneumoniae suşu alınmıştır. Bu izolatlardan 100 E. coli suşunun klonal ilişkisinin araştırılması amacıyla rep-PCR [Diversilab (Repetitive Extragenic Palindromic Element-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)] çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmada 131 izolattın 112 (%85.5)'sinde CTX-M grup 1 enzimi, 43 (%32.1)'ünde TEM tipi, 44 (%32.8)'ünde OXA tipi, 31 'inde hem TEM hem de OXA tipi ve 1 (%0.76) izolatta hem TEM hem de SHV tipi beta-laktamazlar saptanmıştır. Dört (%3) izolatta CTX-M grup 9, 6 (%4.5) izolatta CTX-M grup 1 ve 9, 2 (%1.5) izolatta CIT, 2 (%1.5) izolatta OXA-48 ve 1 (%0.75) izolatta VIM tipi beta-laktamaz tespit edilmiştir. Kinolon direncinden sorumlu aac(6)-Ib gen bölgesi ise 59 E. coli (%54.2), 15 K. pneumoniae (%62.5) suşunda saptanmıştır. Bu gen bölgesine ek olarak, üç E. coli ve bir K. pneumoniae izolatında qnrS, bir K. pneumoniae'da qnrB, bir E. coli'de qepA geni pozitif olarak bulunmuştur. Rep-PCR yöntemi ile E. coli suşlarında iki ana klon bulunmuştur. Ana klonlarda bulunan suşların hepsinde CTX-M grup 1 ve TEM tipi beta-laktamazlar ile aac(6)1b kinolon direnç geninin bulunduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: Klinik örneklerden izole edilen GSBL pozitif enterik bakterilerin çoğunluğunda beta-laktamaz ve kinolon direnç genleri saptanmıştır. Özellikle hastanemizde izole edilen GSBL pozitif izolatlarda CTX-M grup 1 ve aac(6)-Ib gen bölgesinin yaygın olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae; Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; Polimeraz zincir reaksiyonu; rep-PCR

SUMMARY

Investigation of Beta-Lactamases and Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae

Gül BAYRAM¹, Nuran DELIALIOĐLU², Gürol EMEKDAŞ², Candan ÖZTÜRK², Mehmet Sami SERİN³¹ Department of Medical Laboratory, Services, Vocational School of Health Services, Mersin University, Mersin, Turkey² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin, Turkey³ Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mersin University, Mersin, Turkey

Introduction: The production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and their rapid spread among pathogenic bacteria-particularly *Klebsiella* species and *Escherichia coli*-pose serious threats for treatment. In this study, we aimed to investigate beta-lactamase resistance genes and quinolone resistance genes in ESBL-positive *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains.

Materials and Methods: This study was performed by ESBL-positive 108 *E. coli* and 23 *K. pneumoniae* strains. Rep-PCR [Diversilab (Repetitive Extragenic Palindromic Element-Polymerase Chain Reaction)] analysis was made in order to examine colonial association in 100 *E. coli* strains among these isolates.

Results: Out of 113 isolates, 112 (85.5%) were detected to have CTX-M group 1 enzyme, 43 (32.1%) isolates had TEM type, 44 (32.8%) had OXA type, 31 had both TEM and OXA types and 1 (0.76%) had both TEM and SHC type of beta-lactamases. Four (3%) isolates had CTX-M group 9, 6 (4.5%) had CTX-M group 1 and 9, 2 (1.5%) had CIT, 2 (1.5%) had OXA-48 and 1 (0.75%) had VIM type beta-lactamases. *aac(6')-Ib* gene region responsible for resistance to quinolones was detected in 59 (54.2%) *E. coli* and 15 (62.5%) *K. pneumoniae* strains. In addition to this gene region, three *E. coli* isolates and one *K. pneumoniae* isolate were found positive for *qnrS*, one *K. pneumoniae* isolate was found positive for *qnrB* and one *E. coli* isolate was found positive for *qepA* genes. Two main clones were detected in *E. coli* strains by rep-PCR method. All strains found in the main clones were detected to have CTX-M group 1 and TEM type beta-lactamases and *aac(6')-Ib* quinolone-resistance gene.

Conclusion: Majority of the ESBL-positive enteric bacteria isolated from clinical specimens were determined to have beta-lactamases and quinolone-resistance genes. It is observed that CTX-M group 1 and *aac(6')-Ib* gene region are particularly common in ESBL-positive isolates that were isolated in our hospital.

Key Words: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Extended spectrum beta-lactamase; Polymerase chain reaction; rep-PCR.

GİRİŞ

Beta-laktam grubu antibiyotikler çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı için bu antibiyotiklere karşı direnç oluşumu sık görülmektedir.^[1] Gram-negatif bakterilerin çoğu doğal olarak kromozomal genler tarafından kodlanan beta-laktamazlar üretmektedir. Son 20 yıllık dönemde çok sayıda yeni beta-laktam antibiyotik geliştirilmiş ancak tedaviye giren her yeni antibiyotikle birlikte farklı türde beta-laktamaz grupları da ortaya çıkmıştır.^[2]

Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzimi üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yak-

laşık 150 tanesi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)'dir.^[1] GSBL üretiminin *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere patojen bakteriler arasında hızla yayılımı tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır.^[3] GSBL sentezleyen *E. coli* ve *Klebsiella* suşları çoğunlukla birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından bu mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır. GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı çok sayıda epidemiy bildirilmiştir. GSBL üretiminin klinik yanıtı olumsuz etkilediği ve bu mikroorganizmalara bağlı bakteremilerde mortalitenin arttığı araştırmalarda gösterilmiştir.^[4]

Son yıllarda yapılan araştırmalarda GSBL üreten suşlarda kinolon direncinin de görüldüğü belirlenmiştir. Bu direncin plazmid kaynaklı *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qepA* ve *aac(6')-Ib* gen bölgelerinin olduğu gösterilmiştir.^[5] Ülkemizde Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2011 yıllık

raporuna göre; *E. coli* izolatlarında siprofloksasine %46.3, levofloksasine %48.8 oranında direnç olduğu, GSBL pozitif izolatlarda ise bu direnç oranının siprofloksasine ve levofloksasin için %71 olduğu bildirilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında ise siprofloksasin %31.7, levofloksasine %27.5, GSBL pozitif izolatlarda ise siprofloksasine %46.4, levofloksasine %41.8 oranında direnç bildirilmiştir^[6]. GSBL pozitif izolatlarda kinolon direncinin daha fazla olduğu görülmektedir. Laboratuvarımızda 2011 yılında izole edilen *E. coli* suşlarında siprofloksasin direnci %49.9, *K. pneumoniae*'da ise %20.4 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada, yatan hastalardan izole edilen GSBL aktivitesi pozitif olan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile beta-laktamaz ve kinolon direncinden sorumlu gen bölgelerinin belirlenmesi, buna ek olarak da GSBL pozitif olarak saptanan 100 *E. coli* suşunun Repetitive Extragenic Palindromic Element (rep) PCR ile klonal ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Ocak 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden (idrar, kan, doku, apse ve yara) izole edilen GSBL pozitif 131 *Enterobacteriaceae* izolatı (108 *E. coli*, 23 *K. pneumoniae*) çalışmaya alındı. Kliniklerden gönderilen hasta örneklerinin ekimleri uygun besiyelerine yapıldıktan sonra 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kültürde üreyen mikroorganizmalar koloni morfolojileri ve Gram boyalı preparatlar yapılarak değerlendirildi. Gram-negatif enterik bakterilerin tanımlanması için klasik biyokimyasal testler yapıldı. Bu amaçla kligler-iron agar, lizin-iron agar, sitrat, üre, indol, hareket besiyelerine ekimleri yapılarak identifikasyonları yapıldı. Gerekli durumlarda otomatize bakteri identifikasyon sistemi (VİTEK-2, BioMerieux, ABD) kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri Mueller-Hinton agar besiyeri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Etüvde 35°C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası zon çapları ölçülerek CLSI 2012'ye göre değerlendirildi^[7].

GSBL tespiti için çift disk sinerji ve kombine disk difüzyon testleri yapıldı. Çift disk sinerji testinde, 0.5 Mc Farland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar plaklarına ekildi. Amoksisilin/klavulanik asit (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskinin etrafına, merkezden merkeze uzaklık 25 mm olacak şekilde, seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve sefepim (30 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) yerleştirildi. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulanik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, GSBL varlığı açısından pozitiflik olarak kabul edildi. Kombine disk difüzyon testinde; sefotaksim, sefotaksim/klavulanik asit (30 µg/10 µg) ve seftazidim, seftazidim/klavulanik asit (30 µg/10 µg) diskleri kullanıldı. Mueller Hinton agar plaklarına 0.5 Mc Farland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra klavulanik asit içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirildi. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra klavulanik asit içeren antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonuna kıyasla 5 mm veya daha fazla genişse, izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edildi^[7].

GSBL üreten izolatların, enzim tiplerinin saptanabilmesi için öncelikle DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı^[8]. DNA izolasyonunu takiben özgül primerler kullanılarak multipleks PCR ile CTX-M tipi beta-laktam enzimlerinin varlığı araştırıldı^[9]. Multipleks PCR ile beta-laktamaz direncinden sorumlu gen bölgeleri olan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M} (grup 1, 2, 8 ve 25) çalışıldı (Tablo 1). Karbapenem direncinden sorumlu gen bölgelerini belirlemek için karbapenem dirençli iki suşa, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{KPC} ve *bla*_{OXA-48} gen bölgeleri çalışıldı (Tablo 2). PCR karışımı 50 µL olacak şekilde steril distile su, tampon (1X) (Fermentas), MgCl₂ (2.5 mM) (Fermentas, USA), dNTP (200 µL) (Fermentas, USA), Taq polimeraz (2.5 U/µL) (Fermentas, USA), 20 pmol/µL primer (MolBiol, Germany) ve 5 µL ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. CTX-M grubu için; 94°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun

Tablo 1. Beta-laktamaz gen bölgesi için primerler

Hedeflenen beta-laktamaz gen bölgesi	Primer çifti	Amplifikasyon ürünü (baz çifti) (bç)
TEM varyantları TEM-1 ve TEM-2	MultiTSO-T-F-5' CATTTCCTGTCGCCCTTATTC3' MultiTSO-T-R-5' CGTTCATCCATAGTTGCCCTGAC3'	800 bç
SHV	MultiTSO-S-F-5' AGCCGCTTGAGCAAATTAAC3' MultiTSO-S-R 5' ATCCCGCAGATAAATCACCAC3'	713 bç
OXA-1, OXA-4, OXA-30	MultiTSO-O-F-5' GGCACCAGATCAACTTCAAG3' MultiTSO-O-R-5' GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG3'	564 bç
CTX-M grup 1, grup 2 ve grup 9 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-14)	MultiCTXMGp1-F-5' TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^{b3} ' MultiCTXMGp1-2-R- 5' CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^{b3} ' MultiCTXMGp2-F- 5' CGTTAACGGCACGATGAC3' MultiCTXMGp1-2-R-5' CGATATCGTTGGTGGTRCCAT ^{b3} ' MultiCTXMGp9-F-5' TCAAGCCTGCCGATCTGGT3' MultiCTXMGp9-R-5' TGATTCTCGCCGCTGAAG3'	688 bç 404 bç 561 bç
CTX-M grup 8/25 (CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, CTX-M-41)	CTX-Mg8/25-F-5'- AACRCRCAGACGCTCTAC ^{b3} ' CTX-Mg8/25-R-5'TCGAGCCGGAASGTGTAT ^{b3} '	326 bç
ACC-1 ve ACC-2	MultiCaseACC-F-5' CACCTCCAGCGACTTGTAC3' MultiCaseACC-R-5' GTTAGCCAGCATCACGATCC3'	346 bç
FOX-1 ve FOX-5	MultiCaseFOX-F-5' CTACAGTGC GGTTT3' MultiCaseFOX-R-5' CTATTTGCGGCCAGGTGA3'	162 bç
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8, CMY-11 ve CMY-19	MultiCaseMOX-F-5'- GCAACAACGACAATCCATCCT3' MultiCaseMOX-R-5'GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA3'	895 bç
DHA-1, DHA-2	MultiCaseDHA-F-5' TGATGGCAGCAGGATATTC 3' MultiCaseDHA_rev GCTTTGACTCTTTCGGTATTCC	997 bç
LAT-1-3, BIL-1, CMY-2-7, CMY-12-18 ve CMY-21-23	MultiCaseCIT-F-5'CGAAGAGGCAATGACCAGAC3' MultiCaseCIT-R-5'ACGGACAGGGTTAGGATAGYb3'	538 bç
ACT-1 ve MIR-1	MultiCaseEBC-F-5'CGGTAAGCCGATGTTGCG3' MultiCaseEBC-F-5'AGCCTAACCCCTGATACA3'	683 bç
PER-1 ve PER-3	MultiPER-F-5'GCTCCGATAATGAAAGCGT3' MultiPER-R-5'TTCGGCTTGACTCGGCTGA3'	520 bç
VEB-1-6	MultiVEB-F-5'CATTTCCTGATGCAAAGCGT3' MultiVEB-R-5'CGAAGTTTCTTGGACTCTG3'	648 bç

Tablo 2. Karbapenemaz gen bölgesi için primerler

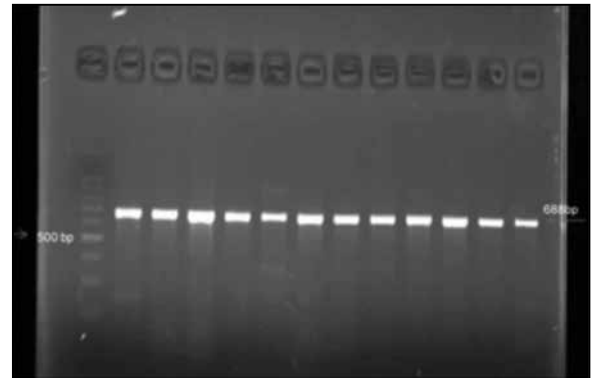
Hedeflenen beta-laktamaz gen bölgesi	Primer çifti	Amplifikasyon ürünü (baz çifti) (bç)
GES-1-9 ve GES-11	MultiGES F-5'AGTCGGCTAGACCGGAAAG3' MultiGES R-5'TTTGTCCGTGCTCAGGAT3'	399 bç
OXA-48-benzeri	MultiOXA-48-F-5'GCTTGATCGCCCTCGATT3' MultiOXA-48-R-5'GATTTGCTCCGTGGCCGAAA3'	281 bç
IMP	MultiIMP F-5'TTGACACTCCATTACDGB3' MultiIMP R-5'GATYGAGAATTAAGCCACYCTb3'	139 bç
VIM	MultiVIM F-5'GATGGTGGTTGGTCCGATA3' MultiVIM R-5'CGAATGCCGAGCACCAG3'	390 bç
KPC	MultiKPC F-5'CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC3' MultiKPC R-5'ACGACGGCATAGTCATTGCT3'	538 bç

Tablo 3. Kinolon direnç gen bölgeleri için kullanılan primerler

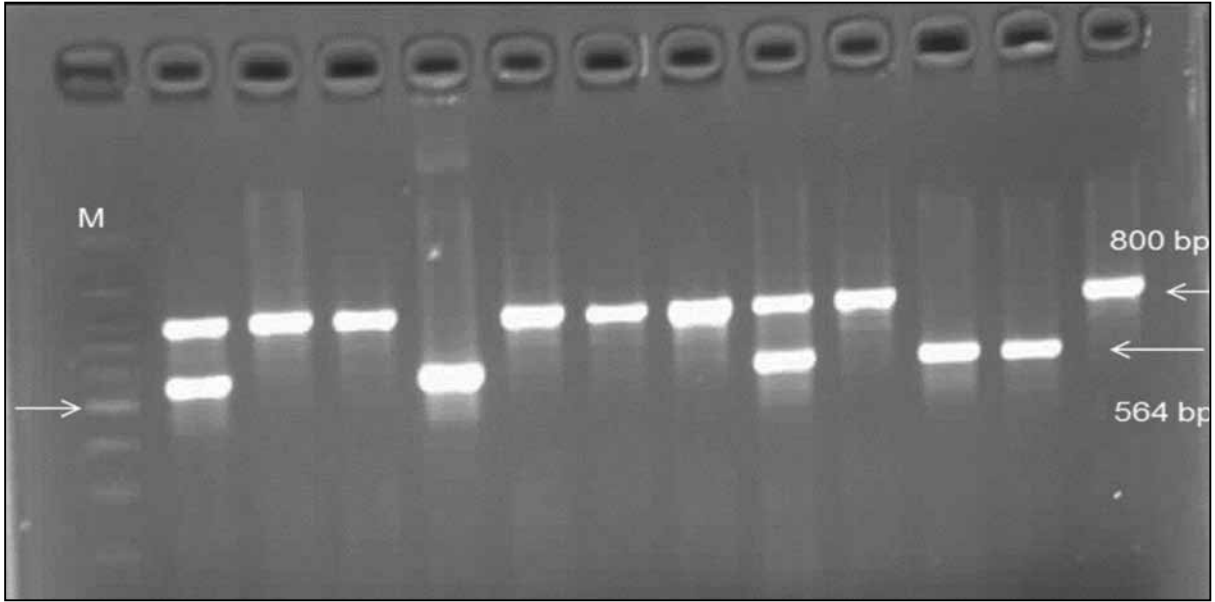
Hedeflenen kinolon gen bölgesi	Primer çifti	Amplifikasyon ürünü (baz çifti) (bç)
<i>qnrA</i>	qnrA1-qnrA6-F 5'AGAGGATTTCTCACGCCAGG3' qnrA1-qnrA6-R 5'TGCCAGGCACAGATCTTGAC3'	580 bç
<i>qnrB</i>	qnrB1-qnrB6 F-5'GGMATHGAAATTCGCCACTG3' qnrB1-qnrB6 R-5'TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA3'	264 bç
<i>qnrS</i>	qnrS1-qnrS2 F-5'GCAAGTTCATTGAACAGGGT3' qnrS1-qnrS2 R-5'TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG3'	428 bç
<i>qnrC</i>	QnrC-F 5'GGTGTGACATTTATTGAATC3' QnrC-R 5'TCCACTTTACGAGGTTCT3'	447 bç
<i>qepA</i>	QepA-F 5'GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG3' QepA-R 5'CTTCCTGCCCGAGTATCGTG3'	199 bç
<i>aac(6)-1b</i>	Aac-F-5'TGA CCT TGC GAT GCT CTA TG-3' Aac-R-5'TTA GGC ATC ACT GCG TGT TC-3'	506 bç

ardından, 30 siklus olarak 94°C'de 40 saniye denatürasyon, 60°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 7 dakika son uzama olarak uygulandı. Karbapenem gen bölgesinin amplifikasyonunda bağlanma sıcaklığı VIM, IMP ve KPC için 55°C, GES ve OXA 48 için 57°C olarak uygulandı. PCR ile kinolon direncinden sorumlu olan *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*), *qepA* ve *aac(6)-1b* gen bölgeleri uygun primerler kullanılarak çalışıldı^[10-12] (Tablo 3). PCR karışımı 50 µL olacak şekilde steril distile su, tampon (1X) (Fermentas), MgCl₂ (2.5 mM) (Fermentas, USA), dNTP (200 µL) (Fermentas, USA), Taq polimeraz (2.5 U/µL) (Fermentas, USA), 20 pmol/µL primer (MolBiol, Germany) ve 5 µL ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. PCR amplifikasyon programı, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* için; 95°C'de 10 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından, 35 siklus olarak 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 10 dakika son uzama, *qnrC* ve *qepA* için 30 siklus olarak, 94°C'de 10 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 30 saniye, 53°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 5 dakika son uzama, *aac(6)-1b* için 35 siklus olarak 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 10 dakika son uzama olarak uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromidli agaroz jele yüklendikten sonra elektroforez işlemine tabi tutuldu.

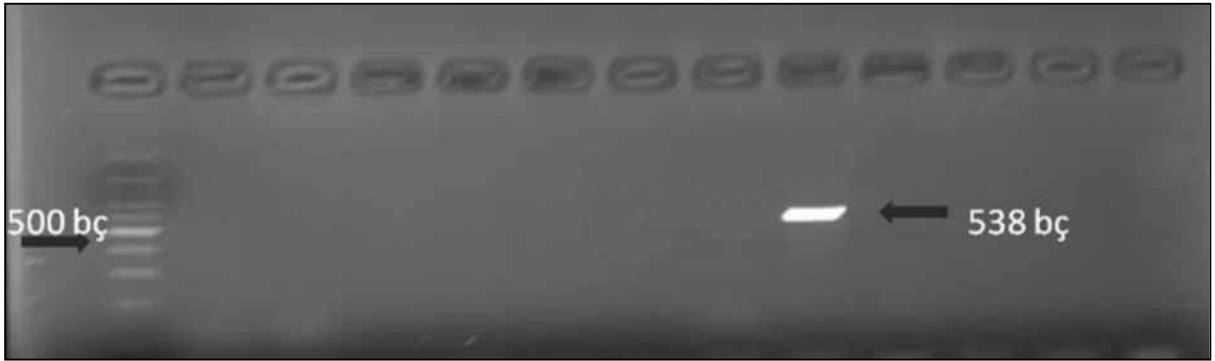
İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için 100 *E. coli* suşu rep-PCR yöntemi ile (Diversilab) çalışıldı. Diversilab sistemine bağlı rep-PCR uygulaması aşamaları; DNA ekstraksiyonu, diversilab parmak izi kitleri ile rep-PCR; diversilab çipleri ile mikro akışkan elektroforez ve internet tabanlı yazılım programıyla sonuçların değerlendirilmesidir. Örneklerin rep-PCR profil benzerliklerinin hesaplanması, DiversiLab yazılımı üzerinde Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi kullanılarak yapıldı. Benzerlik oranı %95'in altında olan örnekler farklı klon, %95'in üzerinde benzerlik ve 1-2 bant farklılığı olan örnekler ana klon ve ayırt edilemez benzerlik yüzdeleri (benzerlik > %97) olan örnekler ana klonun alt tipi olarak (alt klon) değerlendirildi.



Şekil 1. CTX-M grup 1 tipi beta-laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (1. kuyu marker; 2-13. kuyular CTX-M grup 1 tipi beta-laktamaz üreten izolatlar).



Şekil 2. TEM ve OXA grup 1 tipi beta-laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (1. kuyu marker; 2 ve 9. kuyu TEM ve OXA tipi beta-laktamaz; 3, 4, 6, 7, 8, 10 ve 13. kuyular TEM tipi; 5, 11 ve 12. kuyular OXA tipi beta-laktamaz üreten suşlar).

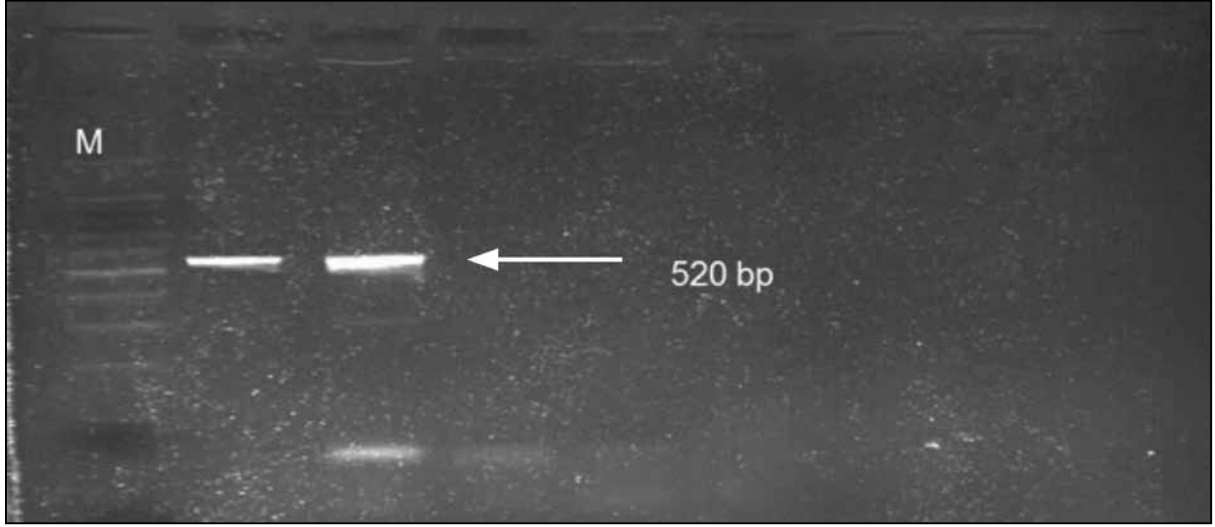


Şekil 3. CIT tipi beta-laktamaz üreten izolatın elektroforez görüntüsü (1. kuyu marker; 9. kuyu CIT tipi beta-laktamaz üreten izolat).

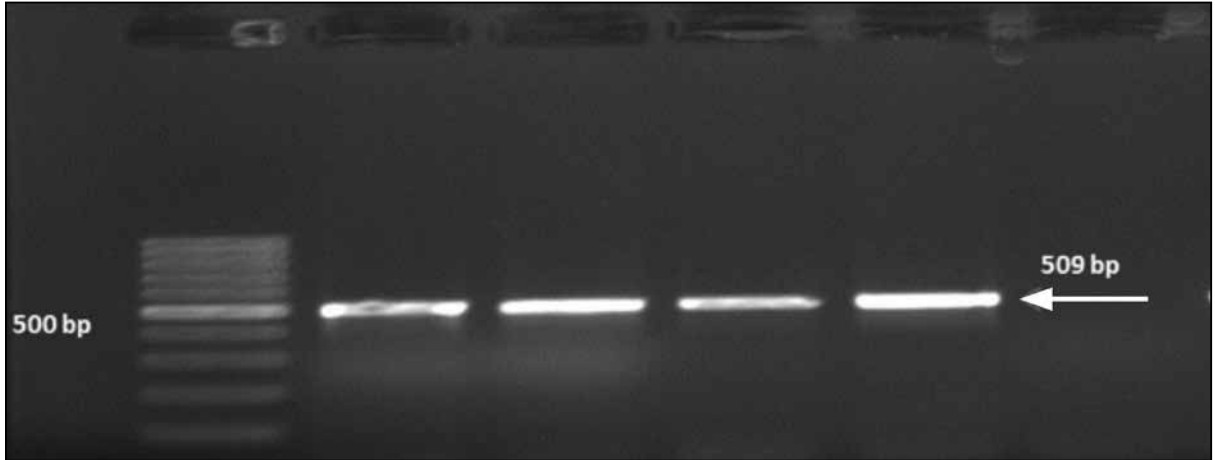
BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 108 *E. coli* ve 23 *K. pneumoniae* susunun; 100 (%76.3)'ü idrar, 19 (%14.5)'u yara, 7 (%5.4)'si kan ve 5 (%3.8)'i doku örneklerinden izole edilmiştir. Bu izolatların; %35.8'i çocuk sağlığı ve hastalıkları, %22.2'si iç hastalıkları, %21.3'ü üroloji, %6.1'i genel cerrahi, %6.1'i infeksiyon hastalıkları, %2.3'ü beyin cerrahisi, %3.1'i kalp ve damar cerrahisi, %3.1'i kadın hastalıkları ve doğum kliniğindeki hastalardan izole edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık test sonucuna göre; 108 *E. coli* susunun, sefoksitine 2 (%1.9)'si, seftazidime 107 (%99.1)'si, seftriaksona 106 (%98.2)'si

ve sefepime 108 (%100)'i dirençli bulunmuştur. İmipenem ve meropeneme dirençli susun olmadığı, diğer antibiyotiklerden ise amikasin 4 (%3.7), gentamisine 58 (%53.7) siprofloksasin, levofloksasin ve ofloksasine 59 (%54.6) ve trimetoprim-sülfametoksazole 74 (%68.5)'ü dirençli olarak tespit edilmiştir. Yirmi üç *K. pneumoniae* susunun; sefoksitine 12 (%52.2)'si, seftazidim, seftriakson ve sefepime yirmi üç (%100)'ü, imipeneme 1 (%4.4)'i ve meropeneme 1 (%4.4)'i, diğer antibiyotiklere ise amikasin 4 (%17.4)'ü, gentamisine 13 (%59.5)'ü, siprofloksasin, levofloksasin ve ofloksasine 15 (%65.2)'i ve trimetoprim-sülfametoksazole 11 (%47.8)'i dirençli olarak bulunmuştur.



Şekil 4. OXA-48 tipi beta-laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (1. kuyu marker; 3 ve 5. kuyular pozitif izolatlar).



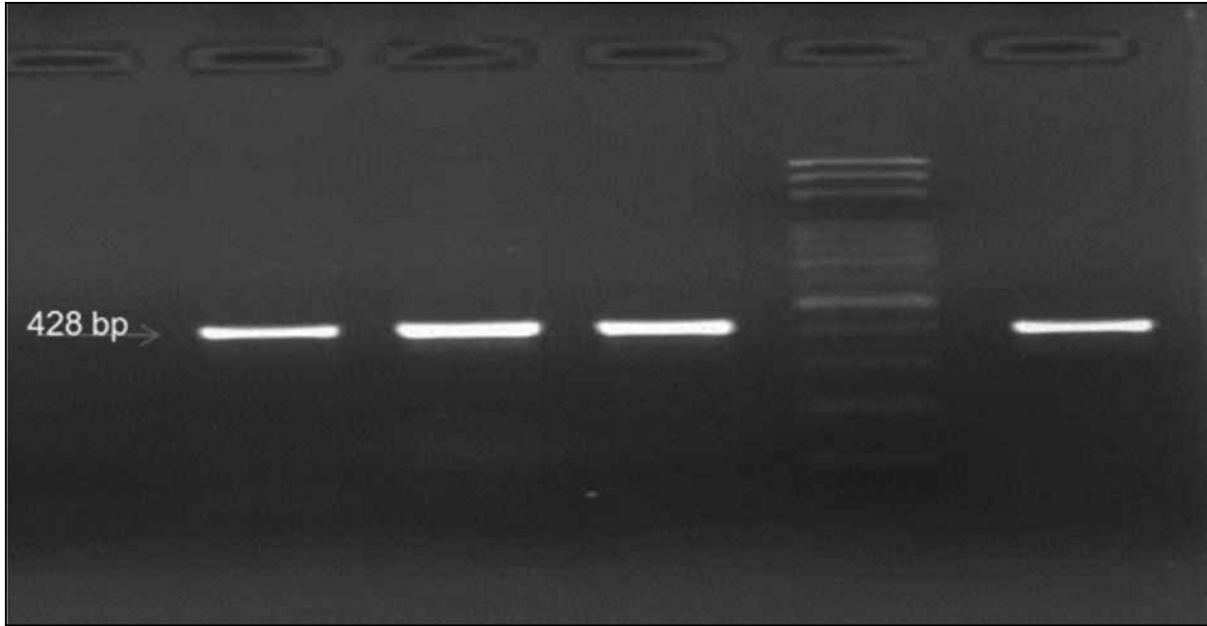
Şekil 5. *aac(6)1b* genine sahip izolatların elektroforez görüntüsü (1. kuyu marker; 1, 2, 3, 4. kuyular pozitif izolatlar).

Çift disk sinerji testi ile *E. coli* suşlarının 107 (%99.1)'si ve *K. pneumoniae* suşlarının 23 (%100)'ü, kombine disk difüzyon testi ile *E. coli* suşlarının 108 (%100)'ü ve *K. pneumoniae* suşlarının ise (%100)'ü GSBL pozitif olarak saptanmıştır. Bu suşların tümünde moleküler yöntemle en az bir veya birden fazla GSBL aktivitesinden sorumlu gen bölgesi tespit edilmiştir.

Bu çalışmada 131 izolatın 112 (%85.5)'sinde CTX-M grup 1 enzimi, 43 (%32.8)'ünde TEM tipi, 44 (%33.8)'ünde OXA tipi, 31 (23.6)'inde hem TEM hem de OXA tipi ve bir izolatta hem TEM hem de SHV tipi beta-laktamazlar saptanmıştır. Dört (%3) izolatta CTX-M grup 9, 6 (%4.5) izolatta CTX-M grup 1 ve 9, 2 (%1.5)

izolatta CIT, 2 (%1.5) izolatta OXA-48 ve 1 (%0.8) izolatta VIM tipi beta-laktamaz tespit edilmiştir (Şekil 1-4).

GSBL pozitif ve kinolon direnci olan 74 suşun çoğunluğu çocuk sağlığı ve hastalıkları (%35.2) ile üroloji kliniğinden (%32.4) gelen örneklerden izole edilmiştir. İzolatların diğer servislerdeki dağılımı ise; genel cerrahi %6.7, kadın hastalıkları ve doğum %1.4, infeksiyon hastalıkları %2.7, ortopedi %1.4 ve iç hastalıkları %20.2 olarak belirlenmiştir. Suşların %91.8'i idrar, %2.7'si doku, %2.7'si yara ve %2.7'si kan örneklerinden izole edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, *aac(6)-Ib* gen bölgesi 59 *E. coli* ve 15 *K. pneumoniae* suşunun tamamında tespit



Şekil 6. QnrS genine sahip izolatların elektroforez görüntüsü (5. kuyu marker; 2, 3, 4 ve 6. kuyular pozitif izolatlar).

edilmiştir (Şekil 5). Bu gen bölgesine ek olarak, 3 *E. coli* ve 1 *K. pneumoniae* izolatında *qnrS* (Şekil 6), 1 *K. pneumoniae*'da *qnrB*, 1 *E. coli*'de *qepA* geni saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *qnrC* ve *qnrA* gen bölgeleri tespit edilmemiştir.

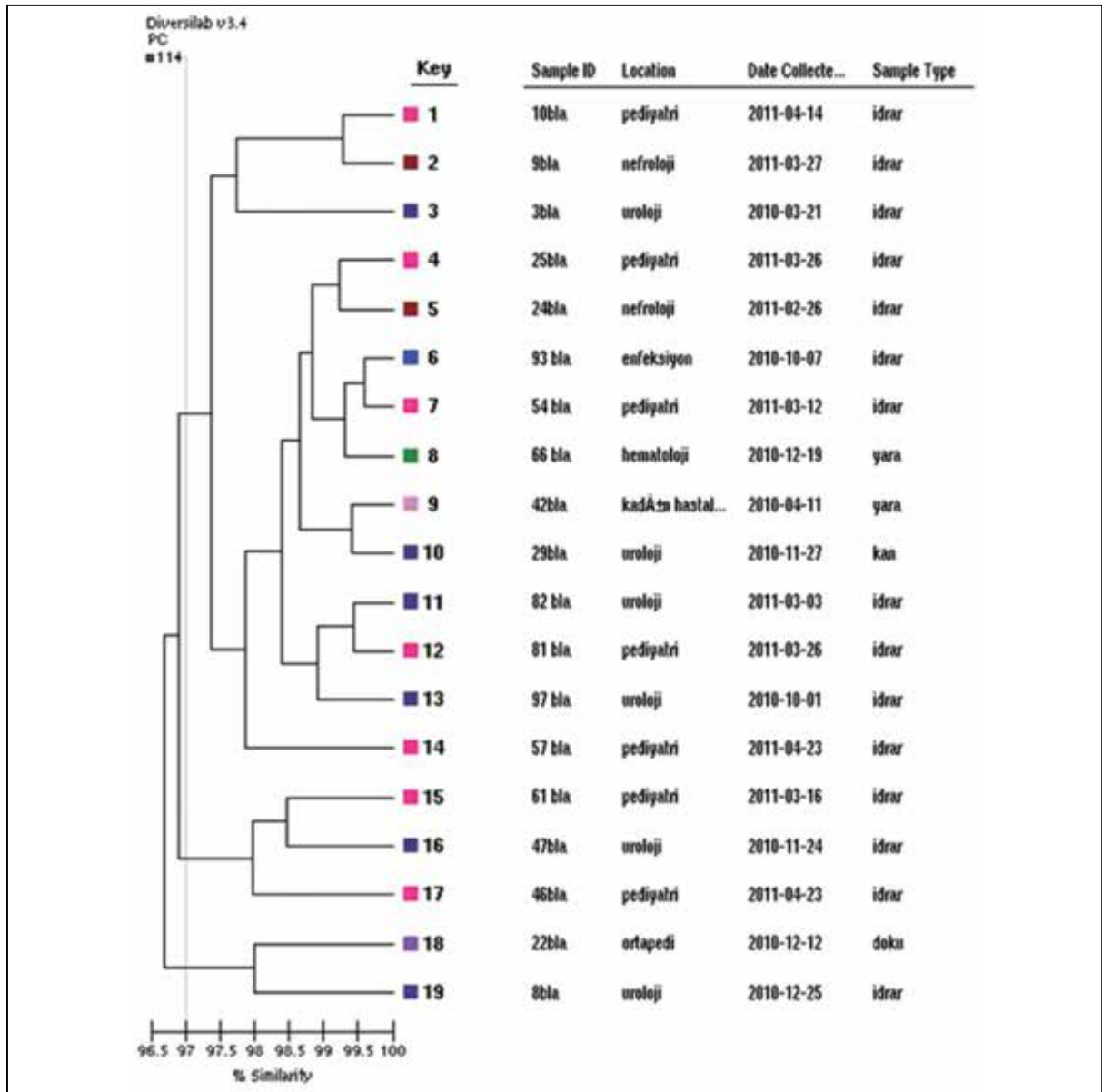
Çalışmada rep-PCR Diversilab yöntemi ile tiplendirilen 100 *E. coli* izolatından ikisi ana klon (1 ve 2) olmak üzere toplam 5 farklı klon (1-5) elde edilmiştir. Birinci ana klon *E. coli*'lerin 19 (%19)'unun toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. İkinci ana klon 11 (%11) suş ile ikinci büyük klondur. Üçüncü klon 2 (%11)'şer suş; dördüncü ve beşinci klon 5'şer (%5) suş içermekteydi. Bunlar dışındaki 42 suşun (%42) diğer klonlarda bulunduğu saptanmıştır. Her iki ana klonda bulunan izolatların çoğunluğu çocuk sağlığı ve hastalıkları ve üroloji kliniklerinden gönderilen örneklerden elde edilmiştir. Ana klonlardaki 30 örnekten 26'sı idrar, biri kan, ikisi yara ve biri dokudur. Örneklerin 11'i çocuk sağlığı ve hastalıkları, 19'u üroloji kliniğinden geldi. Ana klonlardaki suşların hepsinde CTX-M Grup 1 ve TEM tipi beta-laktamazlar ile *aac(6)Ib* kinolon direnç geni saptanmıştır. Özellikle birinci ana klondaki izolatların çocuk sağlığı ve hastalıkları kliniğinden mart ayında gelen örneklerden izole edildiği gözlenmiştir. Her klondan bir suş secilerek klonların

birbirlerine benzerlik oranları, dendrogramlar ve benzerlik matrislerinde gösterilmiştir (Şekil 7-10).

TARTIŞMA

Gram-negatif bakterilerden özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç artışı tedavide zorlukların yaşanmasına neden olmaktadır. 1990'lı yılların sonuna doğru GSBL üreten ve AmpC tipi beta-laktamaz taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatlarının sayısındaki artış dikkat çekicidir^[13]. Günümüzde GSBL prevalansı ülkeden ülkeye değişmekle birlikte araştırmacılar tarafından farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de saptanan en yüksek GSBL oranlarının Hindistan (\geq %80) ve Çin'de (\geq %60) olduğu bildirilmiştir^[14,15]. Bu oranlar Doğu ve Güneydoğu Asya, Latin Amerika ve Güney Avrupa'da \geq %30 iken Avusturalya, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da %5-10 olarak bulunmuştur^[16].

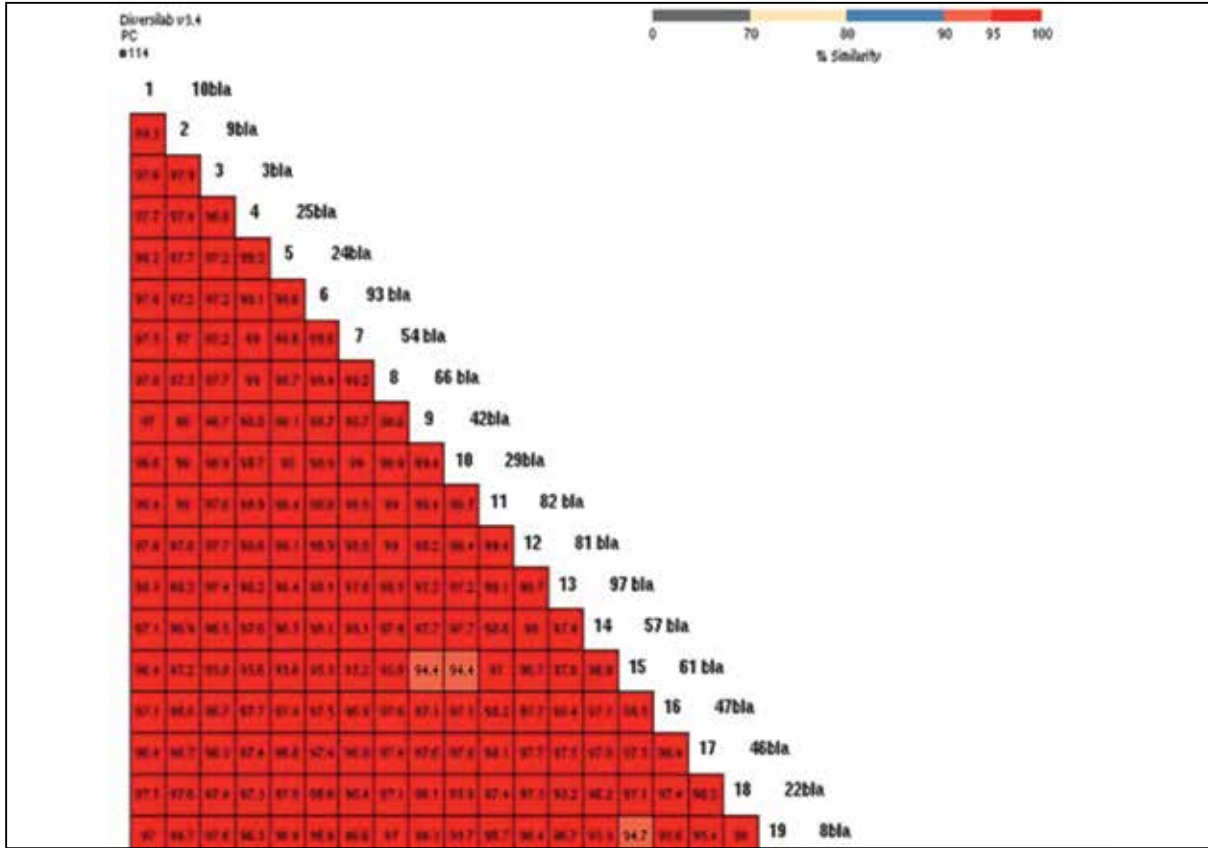
Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde özellikle de *E. coli*'de baskın olan CTX-M tipi GSBL'ler Güney Amerika, Asya ve Avrupa olmak üzere tüm dünyada giderek yaygınlaşmaktadır^[3]. Hansen ve arkadaşları, Danimarka'da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada, 18.259 hastanın kan ve 47.504 hastanın idrar örneklerinden izole edilen GSBL pozitif 352 *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus*



Şekil 7. Ana klon I dendrogram.

mirabilis suşunda ağırlıklı olarak CTX-M-15 ve bunun yanında SHV, OXA ve TEM tipi beta-laktamazları saptanmışlardır^[17]. İspanya'da Alegria ve arkadaşları, GBSL pozitif 162 *K. pneumoniae* suşunun 76 (%67)'sında CTX-M, 31 (%27)'inde SHV ve 6 (%5)'sında TEM tipi beta-laktamazları, Chong ve arkadaşları ağırlıklı olarak CTX-M grup 2, TEM ve SHV tipi beta-laktamazları, Diaz ve arkadaşları CTX-M-14 (119 izolat), SHV-12 (68 izolat), CTX-M-15 (37 izolat) ve CTX-M-9 (21

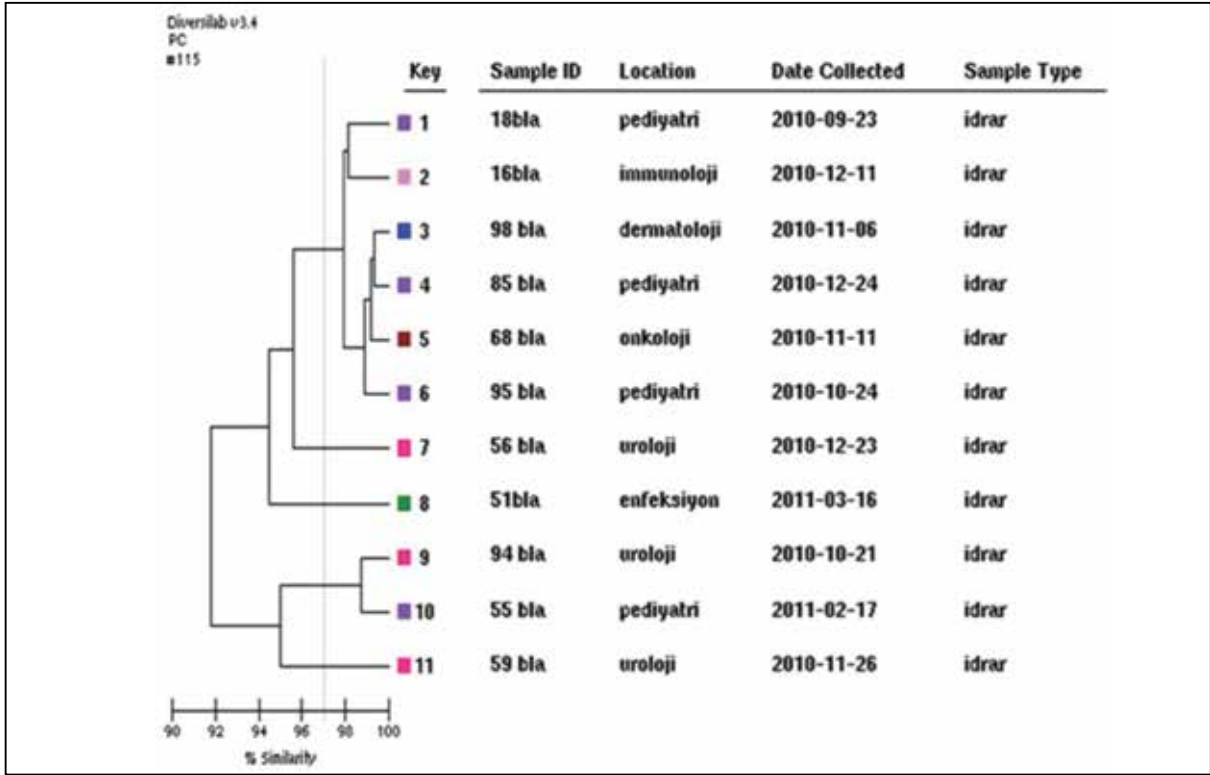
izolat) tipi beta-laktamazları, Peireno ve arkadaşları Kanada'da CTX-M 14 ve 15 tipi beta-laktamazları yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir^[18-21]. İran'da yapılan bir çalışmada, sekiz aylık sürede toplanan 111 *E. coli* izolatının 37 (%33.3)'sinde GBSL aktivitesi saptanmış olup, suşların 35 (%94.6)'inin CTX-M tipi, 21 (%56.8)'inin TEM ve 5 (%13.5)'inin SHV tipi beta-laktamaz taşıdığı tespit edilmiştir^[22]. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda; Bayraktar ve arkadaşları GBSL po-



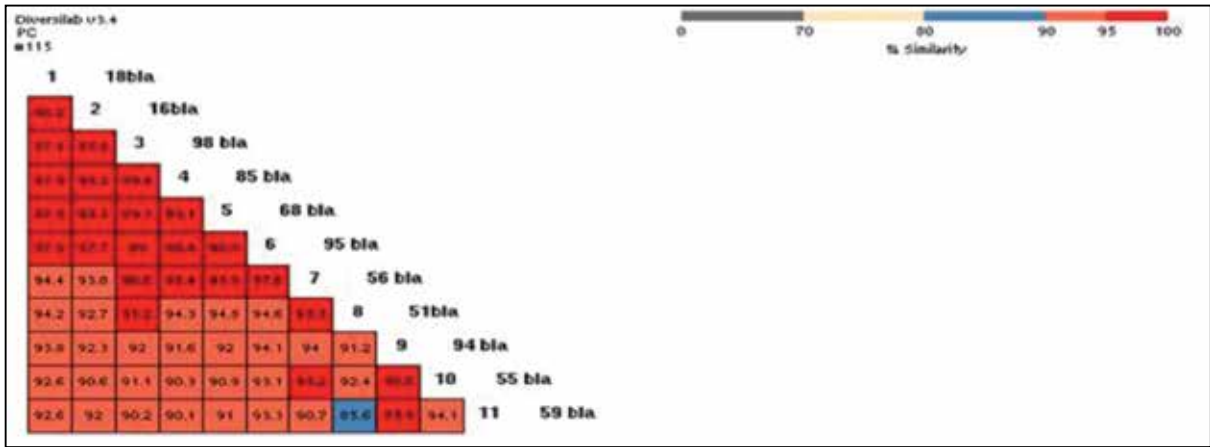
Şekil 8. Ana klon I benzerlik matrisi.

zitif 1640 *Enterobacteriaceae* izolatında CTX-M grup 1, CTX-M grup 2 ve CTX-M grup 9 enzimlerini saptamışlardır^[23]. Güran ve arkadaşları, GSBL üreten 310 *E. coli* suşunun 30 (%9.6)'unda CTX-M-15, 14 (%4.1)'ünde CTX-M-14 tipi beta-laktamazları bildirmişlerdir^[24]. Çalışmamızda yukarıda bahsedilen sonuçlarla benzer olarak 131 izolatın 112 (%85.5)'sinde CTX-M grup 1 enzimi, 4 (%3) izolatta CTX-M grup 9, 6 (%4.5) izolatta CTX-M grup 1 ve 9 birlikte %32.8 TEM tipi, %33.8 OXA tipi, %23.6 hem TEM hem OXA tipi beta-laktamazlar da saptanmıştır. Tüm dünyada sık rastlanan GSBL tipi beta-laktamazların yanı sıra AmpC tipi beta-laktamaz bildirimini de gittikçe artmaktadır. Coşkun ve arkadaşları sefoksitine dirençli 50 izolatın 22 (%88)'sinde multipleks PCR ile AmpC tipi beta-laktamaz saptamışlardır^[25]. PCR ile AmpC pozitif bulunan izolatların hepsinin CIT (CMY-2 ile CMY-7 arası, LAT-1 ile LAT-7 arası ve BIL-1 AmpC beta-laktamazların bulunduğu grup) ailesine ait AmpC tipi beta-lak-

tamazlar olduğunu bildirmişlerdir. Bu izolatların birinde hem CIT hem de EBC tipi AmpC enzim, birinde de CIT ve MOX'un birlikte olduğu görülmüştür. Balıkcı ve arkadaşları, 2008-2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada, 1030 *E. coli*, 286 *Klebsiella* spp. olmak üzere 1316 izolat içerisinde fenotipik olarak sefoksitine dirençli 36 (%2.7) izolatın (%77'si *E. coli*, %23'ü *K. pneumoniae*) sadece 10 (%27.7, tümü *E. coli*)'unda plazmid aracılı AmpC gen varlığı saptanmış olup izolatlarda üretilen enzimlerin CMY-2 tipinde olduğu belirlenmiştir^[26]. Çalışmamızda 2 (%1.5) *E. coli* izolatında CIT grubu AmpC pozitif olarak bulunmuştur. Bu izolatların her ikisinde ayrıca CTX-M grup 1 tipi beta-laktamaz, bir izolatta hem TEM hem de OXA tipi beta-laktamazlar saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa'dan yapılan çalışmalarda enterik bakterilerde metallo beta-laktamaz ve *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) aracılı karbapenem direncinin oldukça büyük sorun oluşturduğu bildirilmektedir^[27]. Yap-



Şekil 9. Ana klon II dendrogram.



Şekil 10. Ana klon II benzerlik matrisi.

tığımız çalışmada karbapenem direnci saptanan iki izolat hastanemizde bu direncin görüldüğü ilk suşlar olup, iki izolatta OXA-48 (%1.5) ve bir izolatta ek olarak VIM (%0.76) tipi beta-laktamaz tespit edilmiştir.

Plazmidler aracılığıyla beta-laktam, makrolid, aminoglikozid gibi birçok antibiyotik grubuna di-

renç geliştüğü bilinmekle birlikte, 1998 yılına kadar kinolon grubu antibiyotiklere plazmidler aracılığı ile direnç gelişebileceği kesin olarak bilinmiyordu. GSBL üreten bakterilerde florokinolonlara karşı yüksek direnç oranları bildirilmektedir. GSBL üreten suşlarda plazmid aracılı kinolon direnci çoklu ilaç direncinin göstergesi olarak sayılabilir^[28]. 2009 yılında "European Antimicrobial Resistan-

ce Surveillance System” tarafından Avrupa’da plazmid aracılı kinolon direncinin Estonya ve Norvec’te %7, Finlandiya’da %8 iken, Malta’da %35, Kıbrıs’ta %40 ve Türkiye’de %53 olduğu bildirilmiştir^[29].

Çalışmamızda *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *qnrC* gen bölgeleri düşük oranda belirlenirken *aac(6’)-Ib* gen bölgesi ise 74 susun tamamında saptanmıştır. Ayrıca tek bir suşta aynı anda birden fazla kinolon gen direncinden sorumlu gen bölgesi belirlenmiştir ve 3 *E. coli* ve 1 *K. pneumoniae* izolatında *qnrS*, bir *K. pneumoniae*’da *qnrB*, bir *E. coli*’de *qepA* geni pozitif olarak bulunmuştur. Bizim yaptığımızla çalışmayla paralel olarak ülkemizde Aktepe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *aac(6’)-Ib* gen oranını %59.8 olarak saptamışlardır ve suşların hiçbirinde *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ve *qnrC* gen bölgelerini tespit etmemişlerdir^[10].

Günümüzde nozokomiyal salgınların belirlenmesinde rep-PCR yönteminin duyarlı, hızlı ve güvenilir olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Rokotohirina ve arkadaşları çoklu ilaç direnci olan 49 GSBL pozitif *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Enterobacter cloacae* izolatının 37 (%75.5)’inde *blaCTX-M-15* ve 39 (%387)’unda *SHV-2* saptamışlardır^[30]. Bu izolatların büyük bir kısmının rep-PCR ile A1 grubunda yer aldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ana klonlardaki suşların hepsinde CTX-M grup 1 ve TEM tipi beta-laktamazlar ile *aac(6’)-Ib* kinolon direnci geni saptanmıştır. Özellikle birinci ana klondaki izolatların çocuk sağlığı ve hastalıkları kliniğinden mart ayında gelen örneklerden izole edildiği ve gen bölgelerinin benzer olduğu gözlenmiştir. Bunun hastanemizde direnci genlerinin klonal bir yayılımının göstergesi olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak gram-negatif enterik bakterilerde farklı direnci mekanizmalarının çeşitlilik kazanması ve direncin farklı bakteriler arasındaki aktarımı bu suşların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, direnci genlerinin ve prevalansının belirlenmesi, uygun tedavi protokollerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Ayrıca, hastane infeksiyonlarında direncin klonal yayılımı ve nozokomiyal salgınların önüne geçilmesi için üniversal izolasyon prensiplerine uyulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-1.
2. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010;300:371-9.
3. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009;73:345-4.
4. Kiratisin P, Henprasert. Genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases amongst Enterobacteriaceae other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to broad-spectrum cephalosporin. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:343-7.
5. Hisakazu Y, Uemura M, Endo S et al. Molecular Characteristics of Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates from *Escherichia coli* at a Japanese tertiary hospital. *Plos One* 2013;8:1-6.
6. Ulusal Antimikrobiyal Direnci Surveyans Sistemi 2011 Yıllık Raporu “Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Erişim tarihi:14 Mart 2015. Available from: <http://uamdss.thsk.gov.tr>.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI. M02-A11 and M07-A9, 2012:40-61.
8. Pitout JDD, Hamilton N, Church DL, Nordmann P, Poirel L. Development and clinical validation of molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect Dis* 2007;13:291-7.
9. Dallenne C, Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:490-5.
10. Aktepe OC, Aşık G, Çetinkol Y, Biçmen M, Gülay Z. *Escherichia coli* suşlarında plazmide bağlı kinolon direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46:9-16.
11. Kim HM, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular characteristics of extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of *qnr* in extended spectrum β -lactamase isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea. *Yonsei Med J* 2010;51:768-74.
12. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6’)-Ib-cr* in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1003-6.
13. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:646-55.

14. Hoban DJ, Nicolle LE, Hawser S, Bouchillon S, Badal R. Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *E. coli*: results from the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:507-11.
15. Hsueh PR, Badal RE, Hawser SP, Hoban DJ, Bouchillon SK, Ni Y, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:408-14.
16. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012;27:128-42.
17. Hansen DS, Schamuer H, Hansen F, Stegger M, Hertz FB, Shonning K, et al. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Danish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence, β -lactamase distribution, phylogroups, and co-resistance. *Scandinavian J Infect Dis* 2012;44:174-81.
18. Alegria RC, Bano JR, Cano ME, Hernandez-Bello JR, Calvo J, Roman E, et al. *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: microbiological and clinical features. *J Clin Microbiol* 2011;49:1134-6.
19. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol* 2011;11:1499-504.
20. Diaz BA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 2010;48:2840-5.
21. Peirano G, Van Der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol* 2012;50:294-9.
22. Moghaddam MN, Forghanifard MM, Moshrefi S. Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase genes (*bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. *Iranian J Basic Med Sci* 2012;15:833-9.
23. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten gram negatif bakterilerde *bla*CTX-M genlerinin araştırılması. *Microbiyol Bul* 2010;44:187-96.
24. Güran M, Akçimen B, Gökmen T, Yaman A, Köksal F. Characterization of CTX-M type extended spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Southern Turkey: The first report of CTX-M-14 producing *Escherichia coli* from Turkey. *Afr J Microbiol Res* 2013;7:551-6.
25. Coşkun S, Altanlar N. AmpC beta laktamazlar. *ANKEM Derg* 2012;26:203-14.
26. Balkçı H, Açıkgöz ZC, Güvenman S, Çelikkilek N, Özdem B. *Escherichia coli* *Klebsiella* spp. izolatlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz üretiminin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014;48:82-93.
27. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413-31.
28. Li XZ. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:453-63.
29. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:3-10.
30. Rakotonirina HC, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A, Arlet G. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiol* 2013;13:1-10.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Gül BAYRAM
Mersin Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri
Mersin-Türkiye
E-posta: gulbayram78@gmail.com