

# Çukurova Bölgesindeki *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Araştırılması

## Investigation of CTX-M Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains in Cukurova Region

Mümtaz GÜRAN<sup>1</sup>, Fatih KÖKSAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

### ÖZET

**Giriş:** Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında, hastane ve toplum kökenli infeksiyonlara ait klinik materyallerden izole edilen, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları arasında, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle, CTX-M tipi beta-laktamaz üreten suşların prevalansının ve enzim tiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metod:** Çalışmaya, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi laboratuvarından izole edilen 300 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatı arasından seçilen 120 GSBL pozitif suş dahil edildi. GSBL pozitif olduğu belirlenen izolatların, ilk olarak VITEK-II sistemiyle antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı, daha sonra da moleküler çalışmalar için plazmid DNA'lar izole edildi. CTX-M genlerinin identifikasyonu PstI ve PvuII restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemiyle yapıldı.

**Bulgular:** Yapılan analizler sonucunda CTX-M tipi GSBL oranı tüm *E. coli* izolatları arasında %36.7, *K. pneumoniae* izolatları arasında ise %31.7 olarak belirlendi, CTX-M tipi GSBL'lerin tüm GSBL'ler arasındaki oranı ise *E. coli* için %87.7, *K. pneumoniae* için %90 bulundu. CTX-M pozitif olan 93 örneğin 88'inde CTX-M-1, beşinde ise CTX-M-9 grubu ile uyumlu restriksiyon profilleri elde edildi.

**Sonuç:** Ülkemizdeki antibiyotik kullanım politikalarının, artan direnç gözardı edilmeyecek şekilde geliştirilmesi gerektiği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** CTX-M, PCR-RFLP, Beta-laktamaz

## SUMMARY

### Investigation of CTX-M Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains in Cukurova Region

Mümtaz GÜRAN<sup>1</sup>, Fatih KÖKSAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Cukurova, Adana, Turkey

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the types of enzymes and prevalence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing strains isolated from clinical material belonging to both nosocomial and community-acquired infections in the central laboratory of our hospital.

**Materials and Methods:** 120 ESBL-positive strains, which were selected among 300 *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from our university hospital laboratory, were included in the study. Isolates determined as ESBL-positive first underwent an antibiotic susceptibility testing using the VITEK-II system; then, plasmid DNA molecules were isolated for molecular studies. Identification of CTX-M genes was done using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in which PstI and PvuII restriction enzymes were used.

**Results:** As a result of the analysis, the CTX-M type ESBL rate was found to be 36.7% among all *E. coli* isolates and 31.7% among *K. pneumoniae* isolates, and the ratio of CTX-M type ESBLs among all ESBL types was found to be 87.7% for *E. coli* and 90% for *K. pneumoniae*. Among 93 CTX-M-positive samples, 88 set restriction profiles were compatible with the CTX-M-1 group and 5 were compatible with the CTX-M-9 group.

**Conclusion:** It is considered that development of antibiotic usage policies in our country is required so as not to ignore the increasing resistance.

**Key Words:** CTX-M, PCR-RFLP, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, beta-lactamase

## GİRİŞ

Beta-laktam antibiyotikler en başarılı antibakteriyel ajanlar olarak kullanılırken, son 20 yılda bu grup antibiyotiklerle tedavi başarısında azalma olmuştur. Tedavi başarısızlığının artışında sebep şüphesiz bakterilerin bu antibiyotiklere karşı geliştirdiği dirençtir. Özellikle gram-negatif bakterilerin tedavisinde kullanılan beta-laktamlara karşı bakterilerin geliştirdiği en önemli direnç mekanizması antibiyotiğin beta-laktam halkasını inaktive ederek etki gösteren beta-laktamaz enzimleridir. Beta-laktam grubu antibiyotiklerle tedavide elde edilen başarısızlık beta-laktamaz enzimlerinin gelişimiyle ters orantılı olup, insanoğlu yavaşça yeni antibiyotikler geliştirirken bakteriler bu antibiyotiklere karşı beta-laktamaz enzimlerini hızla geliştirmekte böylece enzimlerin spektrumunda artış gözlemlenmektedir.

Günümüzde pek çok beta-laktam grubu antibiyotigi hidrolize edebilme yeteneğine sahip olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ciddi bir klinik problem oluşturmaktadır<sup>[1]</sup>. Yoğun klinik kullanım baskısı özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinden tüm dünyada pek çok değişik tipe GSBL izolasyonunu ve tanımlanmasını sağlamıştır<sup>[2]</sup>. Bu GSBL türlerinden

günümüzde en yaygın olanı ilk olarak 1980'li yılların başında rapor edilen ve 1995 yılından bu yana tüm dünyada dramatik bir artış gösteren CTX-M tipi enzimlerdir<sup>[3]</sup>.

Otuzdan fazla değişik tipi bulunan CTX-M enzimlerinin özelliği adlarından da anlaşılacağı gibi sefotaksimi seftazidime kıyasla çok daha iyi hidrolize edebilmeleridir<sup>[4]</sup>. Özellikle aminopenisilinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı yüksek düzeyde direnç oluşumuna neden olan bu enzimler seftazidime oranla sefotaksime gösterdikleri yüksek dirençle karakterizedir<sup>[3]</sup>. Ancak yoğun antimikrobiyal baskı nedeniyle bu enzimleri taşıyan bakterilerin, geliştirdikleri mutasyonlarla enzimlerini geliştirdikleri ve yeni CTX-M varyantları oluşturdukları dolayısıyla seftazidim gibi duyarlı olduğu bilinen antibiyotiklere karşı da direnç geliştirebildikleri görülmüştür<sup>[5-7]</sup>.

Bu çalışmada, üniversitemiz hastanesindeki çeşitli polikliniklerden izole edilen, GSBL sentezleyen, toplum kökenli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarından izole edilen CTX-M tipi beta-laktamazların epidemiyolojisinin ve genotip-fenotip ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Bakteriyel İzolatlar

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 2010-2011 yıllarında 12 aylık süre içerisinde, çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen 300 (215 *E. coli*, 85 *K. pneumoniae*) klinik materyalden izole edilen ve VITEK-II cihazıyla GSBL ürettiği belirlenen, 90'ı *E. coli*, 30'u *K. pneumoniae* olarak tanımlanan toplam 120 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Tür tanısı açısından VITEK-II cihazının doğrulanması için örnekler tekrardan enterobakterilerin identifikasyonunda rutin olarak kullanılan mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlere tabii tutulmuştur. GSBL sentezinin doğrulanması için "Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)"ün önerdiği çift disk sinerji testi kullanılmıştır.

### Antibiyotik Duyarlılık testleri

İzolatların ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, aztrenonam, gentamisin, siprofloksasin, imipenem ve trimetoprim-sülfametoksazol antibiyotiklerine karşı direnç analizi VITEK-II sistemiyle gerçekleştirilmiştir.

### PCR-RFLP ile CTX-M Geninin İdentifikasyonu

Tür düzeyinde tanısı doğrulanmış ve GSBL sentezlediği fenotipik testle gösterilen izolatlardan moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere plazmid DNA ekstraksiyonu işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon için literatürde "Alkalin Lizis Metodu" olarak anılan yöntem kullanılmıştır<sup>[8]</sup>. Ekstraksiyonu tamamlanan örneklerle işlemin başarılı olup olmadığını test etmek için ise spektrofotometre yardımıyla 260 nm'de DNA ölçümü yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucu elde edilen plazmid DNA konsantrasyonu 0.1-1.2 µg/µL arası olan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.

Ekstrakte edilen DNA örnekleri ilk önce 543 bp' uzunluğundaki CTX-M geninin varlığı açısından değerlendirilmek üzere CTX-M/F" (5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3') ve CTX-M/R"(5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3') konsensus primerleri kullanılarak Edelman ve arkadaşlarının protokolüne göre amplifikasyona sokuldu<sup>[9]</sup>.

PCR-RFLP çalışmalarını için kalıp olarak plazmid DNA'sından konsensus primerlerle çoğaltılan CTX-M genine ait ampikonlar kullanılmıştır. Uygulamadan

önce BLAST programı kullanılarak belirlenen CTX-M referans dizileri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) üzerinde PstI kesim noktaları (5'-CTGCA<sup>^</sup>G-3', 3'-G<sup>^</sup>ACGTC-5') ve PvuII kesim noktaları (5'-CAG<sup>^</sup>CTG-3', 3'-GTC<sup>^</sup>GAC-5') araştırılarak muhtemel fragment polimorfizmi tespit edildi. Restriksiyonun reaksiyon uygulamasında ticari olarak temin edilen enzimlerin üretici firma tarafından belirlenen reaksiyon şartlarına uyulmuştur. Ampikonlar PstI ve PvuII restriksiyon enzimleriyle hazmettirilerek elde edilen restriksiyon fragmanlarının polimorfizmine göre CTX-M alt grup tayinine gidilmiştir.

Tüm PCR-RFLP aşamaları bir pozitif kontrol, bir negatif kontrol eşliğinde ve negatif örneklerin en az iki kere tekrarlanıp, sağlamlarının yapıldığı şartlarda gerçekleştirildi.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki izolatların antibiyotik direnç oranlarının istatistiksel değerlendirilmesinde veriler SPSS 10.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA) programına aktarılarak istatistiksel analiz yapıldı. İstatistiksel analizde gruplar arasındaki farklar "Fisher's exact T test" ile belirlendi ve p< 0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

VITEK-II otomatize sisteminin doğrulanması amacıyla yapılan fenotipik tür identifikasyon testleri ve çift disk sinerji testleri sonucunda VITEK-II sisteminin %100 oranında doğru sonuç verdiği, GSBL pozitif izolatların 90'ının *E. coli*, 30'unun ise *K. pneumoniae* suşu olduğu belirlenmiştir. İzolatların çeşitli antibiyotiklere karşı yapılan direnç değerlendirmelerinde görülen dirençli suşların dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda CTX-M-1 ve CTX-M-9 grubu GSBL sentezleyen dirençli *E. coli* suşlarının sayısında sadece seftazidime karşı istatistiksel olarak anlamlı derecede fark görülmüştür (CTX-M-1= 58, CTX-M-9= 1; p= 0.0134). Ayrıca, GSBL sentezleyen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında da amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonuna karşı dirençli suş sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark görülmüştür (*E. coli*= 39, *K. pneumoniae*= 22; p= 0.0036).

Plazmid DNA'larının CTX-M genlerinin varlığı açısından CTX-M konsensus primerleriyle amplifiye edilerek değerlendirildiği çalışmamızda; *E. coli* izolat-

**Tablo 1. İzolatların çeşitli antibiyotiklere karşı yapılan direnç değerlendirmelerinde görülen dirençli suşların dağılımı ve yüzdesi**

Antibiyotikler	<i>E. coli</i> (n=79)		<i>K. pneumoniae</i> (n=27)		p <sup>d</sup>	p <sup>e</sup>
	CTX-M-1 <sup>a</sup> n (%)	CTX-M-9 <sup>b</sup> n (%)	Toplam n (%)	CTX-M-1 <sup>c</sup> n (%)		
Ampisilin	74 (100)	5 (100)	79 (100)	27 (100)	1.0000	1.0000
Amoksisilin+ klavulanik asit	38 (51)	1 (20)	39 (49)	22 (81)	0.3589	<b>0.0036</b>
Sefotaksim	74 (100)	5 (100)	79 (100)	27 (100)	1.0000	1.0000
Seftazidim	58 (78)	1 (20)	59 (67)	15 (56)	<b>0.0134</b>	0.2395
Sefepim	36 (49)	2 (40)	38 (48)	13 (48)	1.0000	1.0000
Seftriakson	66 (89)	4 (80)	70 (89)	22 (81)	0.4630	0.3407
Aztreonam	56 (77)	4 (80)	60 (76)	18 (67)	1.0000	0.4483
Gentamisin	37 (50)	4 (80)	41 (52)	11 (41)	0.3606	0.3759
Siprofloksasin	39 (53)	2 (40)	41 (52)	16 (59)	0.6675	0.6553
İmipenem	0	0	0	0	0.000	0.000
Trimetoprim- sülfametoksazol	42 (57)	4 (80)	46 (58)	17 (63)	0.3938	0.8212

<sup>a</sup> CTX-M-1 grubu GSBL sentezleyen dirençli *E. coli* izolatları.

<sup>b</sup> CTX-M-9 grubu GSBL sentezleyen dirençli *E. coli* izolatları.

<sup>c</sup> CTX-M-1 grubu GSBL sentezleyen dirençli *K. pneumoniae* izolatları.

<sup>d</sup> CTX-M-1 ve CTX-M-9 grubu GSBL sentezleyen dirençli *E. coli* izolatları arasındaki p değeri.

<sup>e</sup> CTX-M tipi GSBL sentezleyen dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasındaki p değeri.

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

**Tablo 2. GSBL pozitif suşlardaki CTX-M dağılımı**

	Toplam	GSBL pozitif	CTX-M pozitif	CTX-M-1 pozitif	CTX-M-9 pozitif
<i>E. coli</i>	215	90	79	74	5
<i>K. pneumoniae</i>	85	30	27	27	-
Toplam	300	120	106	101	5

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

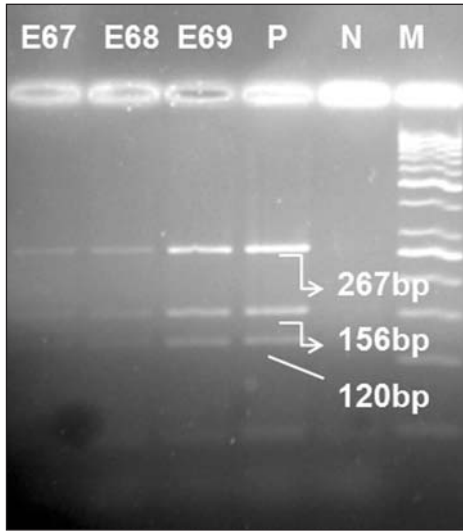
larının 79'u ile *K. pneumoniae* izolatlarının 27'sinde olmak üzere toplam 93 test suşunda CTX-M tipi GSBL geni tespit edilmiştir (Tablo 2). Buna göre CTX-M tipi GSBL oranı tüm *E. coli* izolatları arasında %36.7, *K. pneumoniae* izolatları arasında ise %31.7 olarak belirlenmiştir, CTX-M tipi GSBL'lerin tüm GSBL'ler arasındaki oranı ise *E. coli* için %87.7, *K. pneumoniae* için ise %90 bulunmuştur.

CTX-M tipi enzimlerin alt gruplarının tespiti amacıyla uygulanan PCR-RFLP yönteminde kalıp DNA olarak CTX-M konsensus primerleriyle gerçekleştirilen amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünleri

kullanılmıştır. DNA kalıplarının PstI ve PvuII enzimleriyle restriksiyonu sonunda CTX-M pozitif olan 93 örneğin 88'i CTX-M-1 grubu ile uyumlu 260, 176 ve 156 bp'lik restriksiyon profili sergilemiştir. Örneklerin beşinde ise CTX-M-9 grubu ile uyumlu 426, 72, 45 bp'lik spesifik bandlar elde edilmiştir. CTX-M-1 grubuna özgü restriksiyon paternleri Resim 1'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

GSBL'ler tüm dünyada gram-negatif bakteriler arasında giderek artan sıklıkta görülen çoklu ilaç di-



**Resim 1. CTX-M-1 grubuna özgü restriksiyon patternleri. E67-E69: CTX-M-1 grubu çalışma örnekleri; M: 50 bp Marker; P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol.**

rencinin önemli bir sebebi haline gelmiştir. Bu enzimler içerisinde ilk olarak 1980'li yılların sonlarında farklı bölgelerden izole edilen gram-negatif bakteriler arasında sporadik olarak bildirilen, CTX-M tipi, özellikle de CTX-M-15 alt tipi, GSBL enzimler, günümüzde hızla yayılarak en sık karşılaşılan GSBL haline gelmiştir.

CTX-M türü GSBL enzimlerinin antibiyotik direnç profillerine bakıldığında, CTX-M gen ekspresyonunu çok düşük olan Kluyvera türleri dışında laboratuvar ve doğal *E. coli* suşlarında, CTX-M tipi beta-laktamazlar, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı yüksek düzeyde direnç oluşumuna neden olur. Bu enzimler 7-alfa-metoksisefalosporinler ve karbapenemlere karşı ise duyarlıdır<sup>[10]</sup>.

Birçok CTX-M tipi enzimde oksiminio sefalosporinlerden sefotaksim ve seftriaksona karşı yüksek direnç görülürken, sefepim ve sefpiroma karşı görülen direnç değişkendir. Bunun yanında son zamanlarda seftazidimin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinde önemli bir artış gözlenmesine rağmen çoğunlukla duyarlılık sınırlarını geçememekte, varyantlarda gözlenen bu değişimler seftazidim direncinde artışlar olabileceğini düşündürmektedir<sup>[4-7]</sup>. Bizim çalışmamızda test edilen sefalosporinlerden sefotaksime karşı bütün suşların dirençli olduğu, seftazidi-

me karşı ise *E. coli* izolatlarının %67'sinin, *K. pneumoniae* izolatlarının ise %56'sının dirençli olduğu gözlemlendi. Sefotaksime nazaran seftazidime karşı görülen dirençli suş sayısındaki bu düşüş CTX-M enzimlerinde edinilen direncin karakteristik özelliğidir ve çalışmamızda da bu özellik istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek rakamlarla gösterilmiştir. Bunun yanında *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonuna karşı görülen dirençte de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Çeşitli yöntemlerle (çift disk sinerji metodu, E-test) yurt dışında yapılan çalışmalarda GSBL üretimi *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da sırasıyla; %10-12, %25-26, %2-20 (beş yıllık ortalama), %10-11, %10-32 ve %5-37 olarak bulunmuştur<sup>[11-16]</sup>. Türkiye'de de GSBL üreten gram-negatif bakterilerin varlığı çok sayıdaki çalışmayla gösterilmiştir. Örneğin; Güler ve arkadaşları GSBL oranını çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *E. coli* suşlarında %10.5 olarak bildirirken, Çelebi ve arkadaşları %54.4'lük oldukça yüksek bir prevalans oranı tespit etmişlerdir<sup>[17,18]</sup>. Bozkurt ve arkadaşları hastane infeksiyonu etkeni GSBL üreten *E. coli* suşlarının prevalansını %24.4 olarak bildirmişlerdir<sup>[19]</sup>. Yetkin ve arkadaşları da Malatya'da yaptıkları bir çalışmada kan kültürlerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarında GSBL pozitiflik oranını %34.5 olarak belirlemişler, ayrıca bu suşların polikliniklere, servislere, yoğun bakım ünitelerine dağılım oranlarının sırasıyla; %10.5, %52.6, %36.8 olduğunu belirterek GSBL üreten toplum kökenli suşların varlığına vurgu yapmışlardır<sup>[20]</sup>. Bu grup ayrıca, idrar örneklerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarını değerlendirmişler ve bu suşlar arasında GSBL üretim prevalansını %30.3 olarak bildirmişlerdir<sup>[21]</sup>. Benzer şekilde Gazi ve arkadaşları yatan hastalardan izole ettikleri *E. coli* suşlarının %17.8'i ile poliklinik hastalarından izole ettikleri suşların %9.8'inde, Güdücüoğlu ve arkadaşları yatan hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarının %47'si ile poliklinik hastalarından izole edilen suşların %18'inde GSBL pozitiflik oranı bildirmişlerdir<sup>[22,23]</sup>. Koçoğlu ve arkadaşları da toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole ettikleri *E. coli* suşlarında GSBL prevalansının %3.4 olduğunu bildirmişlerdir<sup>[24]</sup>. Bu çalışmalar toplum kökenli suşlar arasında GSBL varlığının tüm dünyada olduğu gibi ülkemizin de bir gerçeği olduğunu göstermiştir.

Diğer taraftan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar %3.4 ila %54.4 arasında seyreden GSBL oranlarının ne kadar değişken olduğuna dair bir gösterge olmuştur. Bizim çalışmamızda *E. coli*'de GSBL oranı %41.8 olarak bulunurken, *K. pneumoniae*'da bu oranın %43.8 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumlu ve toplumda *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL sentezlenmesini sağlayan genlerin ne denli yayıldığına dair bir delil teşkil etmektedir. Toplum kökenli izolatların çalışıldığı bizim çalışmamız ve benzer pek çok çalışmanın sonuçları ışığında; toplum kökenli *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülen antibiyotik direncindeki artışta en önemli faktör olduğu bilinen bilinçsiz antibiyotik kullanımının azalması amacıyla, ülkemiz gibi reçetesiz antibiyotik kullanılabilen ülkelerde bu politikanın tekrardan gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

CTX-M grubu GSBL enzimlerinin büyük bir kısmı plazmidlerce kodlanan ve transfer edilebilen genlerdir<sup>[25]</sup>. Çalışmamızda kullandığımız plazmid ekstraksiyon protokolü sonucu elde edilen CTX-M genleri bu bilgiyi destekler niteliktedir ancak yayılımın mekanizmasının tam olarak açıklanabilmesi için PFGE, MLST gibi yöntemlerle daha geniş çaplı araştırmaların yapılması gereklidir. Çalışmamızda GSBL pozitif örnekler içinde CTX-M genlerinin oranı *E. coli*'de %87.7 (79/90) *K. pneumoniae*'da ise %90 (27/30) bulunmuştur. Son yapılan çalışmalarda Bindayna ve arkadaşları Bahreyn'de bu oranı *E. coli* için %72.7 *K. pneumoniae* için ise %10 olarak bildirmişler, Çin'den Ho ve arkadaşları bu oranı *E. coli* için %98.2 olarak rapor etmişlerdir. Mugnaioli ve arkadaşları 2003 yılında İtalya'da 11 merkezin katıldığı ulusal bir çalışmada hem hastane hem de toplum kökenli izolatlar arasında CTX-M-15 başta olmak üzere izolatların tamamının CTX-M-1 grubu ile ilişkili olduklarını bildirmişlerdir<sup>[26-28]</sup>. Ülkemizdeki verilere bakıldığında; Demirbakan ve arkadaşlarının Haziran 2004, Ocak 2005 tarihleri arasında kapsayan, Türkiye'den altı merkezin katıldığı ve kan örneklerinden izole edilen 457 *E. coli*, 390 *K. pneumoniae*, 194 *Pseudomonas aeruginosa* ve 155 *Acinetobacter baumannii* suşlarını dahil ettikleri çok merkezli çalışmalarında, GSBL üreten izolatların, %71.4'ünde CTX-M tipi enzimlerin üretildiği, CTX-M-15 subtipinin %69.4'lük oranla en yüksek prevalansa sahip CTX-M tipi olduğu, bunu %28.6'luk oranla CTX-M-3 ve %2'lik oranla CTX-

M-1 enzimlerinin izlediğini belirtmişlerdir<sup>[29]</sup>. Bir başka çalışmada ise Ünver ve arkadaşları Nisan-Aralık 2006 tarihleri arasında parazitolojik tetkik amacıyla toplanan 250 dışkı örneğinden izole ettikleri tüm *Enterobacteriaceae* üyelerini önce GSBL enzim üretimi yönünden, daha sonra da enzim üreten izolatları spesifik primerler kullanarak TEM, SHV ve CTX-M tipi enzim gruplarının prevalansı yönünden test etmişler ve sonuçta GSBL üreticisi 38 kökenin 34 (%89.4)'ünde CTX-M geni tespit etmişlerdir<sup>[30]</sup>. Gülay ve arkadaşları da GSBL üreten 23 *K. pneumoniae* suşunu değerlendirdikleri çalışmalarında, CTX-M prevalansını %82.6 olarak tespit etmişler ve dizi analizi yöntemiyle CTX-M enzimlerinin CTX-M-1 grubunun CTX-M-3 alt tipine ait olduklarını bildirmişlerdir<sup>[31]</sup>. Bizim CTX-M prevalansının *E. coli*'de %87.3, *K. pneumoniae*'da %88.9 olduğuna dair bulgularımız ülkemizdeki ve dünyadaki pek çok çalışmada elde edilen %60-100 arasındaki değişken CTX-M oranlarıyla uyumlu ve CTX-M genlerinin gram-negatifler arasında en sık görülen GSBL türü olduğu bilgisini doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak; yukarıda bahsi geçen çalışmalar ve bizim çalışmamız değerlendirildiğinde GSBL prevalansının halen artış gösterdiği, GSBL'ler arasında ise CTX-M tipinin artık neredeyse her izolatta bulunabilecek sıklıkta olduğu, bu sebeple gram-negatif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde CTX-M genlerinin göz önünde bulundurulması ve her suşa CTX-M pozitif olduğu varsayılarak yaklaşılması gerektiği düşünülmüştür. Dünyada artık CTX-M enzimlerinin normalde duyarlı olduğu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilen mutant suşlar gündeme gelmiştir. Bazı bölgelerde bu enzimleri taşıyan suşlar epidemiler yapmış olmasına rağmen bizim çalışmamızda henüz böyle bir suşla karşılaşmamış olmamız ise bölgemiz açısından umut vericidir. CTX-M tipi GSBL enzimi üreten gram-negatif patojenlerin, toplum içerisinde, antibiyotik kullanım alışkanlığı, nüfus yoğunluğu ve genel hijyenik yapılanma gibi faktörlerin etkisi altında ülkeler, coğrafi bölgeler ve hastaneler arasında farklılıklar gösterebileceği dikkate alınarak, antibiyotik dirençli CTX-M tipi GSBL üreten suşların kontrol altına alınabilmesi ve yeni antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin en aza indirilerek geciktirilmesi için, moleküler düzeyde CTX-M grup ve alt gruplarının izlenmesi açısından çalışmaların kesintisiz devam ettirilmesinin faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

**KAYNAKLAR**

1. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infection* 2003;47:273-95.
2. Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2005;11:1-16.
3. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
4. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1031-4.
5. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201:237-41.
6. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL. CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:29-35.
7. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp240Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2269-75.
8. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-23.
9. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3724-32.
10. Rasmussen JW, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Can J Microbiol* 2004;50:137-65.
11. Kader AA, Kumar A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *Ann Saudi Med* 2005;25:239-42.
12. Del Carmen Rodriguez M, Vera DE, Ramirez- Ronda CH, Saavedra S. Phenotypic confirmation of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at the San Juan Veterans Affairs Medical Center. *P R Health Sci J* 2004;23:207-15.
13. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioter* 2003;16:233-8.
14. Kader AA, Angamuthu K. Extended-spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and other gram-negative bacteria in a hospital in Eastern Province, Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2005;26:956-9.
15. Bishara J, Livne G, Ashkenazi S. Antibacterial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Isr Med Assoc J* 2005;7:298-301.
16. Tonkic M, Goic-Barisic I, Punda-Polic V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Int Microbiol* 2005;8:119-24.
17. Bonnet R, Sampaio JLM. A novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3061-8.
18. Arakawa Y, Ohta, M, Kido N. Chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:63-70.
19. Eryilmaz M, Bozkurt ME, Yıldız M, Akın A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz sıklığının araştırılması. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010;14:10-2.
20. Akyar I. Antibiotic resistance rates of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* strains isolated from urinary tract infections in a private hospital. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:713-5.
21. Yetkin G, Kuzucu C, Çalışkan A, Ay S. Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*'lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2006;13:147-50.
22. Gazi H, Sürücüoğlu S, Kurutepe S. İdrar kültürlerinden izole edilen gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç. *ANKEM* 2007;21:19-22.
23. Gündüçoğlu H, Baykal S, İzci H, Berktaş M. Genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotiklere direnci. *ANKEM* 2007;21:155-60.
24. Koçoğlu E, Karabay O, Koç İnce N, Özkardeş F, Yıldırım R. Toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz ve bazı antibiyotiklere direnç sıklığının araştırılması. *ANKEM* 2007;21:5-9.
25. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Can J Microbiol* 2004;50:137-65.
26. Bindayna KM, Murtadha M. High prevalence of blaCTX-M in Enterobacteriaceae isolates from the Kingdom of Bahrain. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011;937-40.
27. Ho PL, Yeung K, Lo WU, Tse H, Li Z, Lai EL, et al. Predominance of pHK01-like incompatibility group FII plasmids encoding CTX-M-14 among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Hong Kong, 1996-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:182-6.

28. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2700-6.
29. Gür D, Gülay Z, Akan OA, Aktaş Z, Kayacan CB, Cakici O, et al. Resistance to newer beta-lactams and related GSBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:537-34-212.
30. Ünver D, Küçükbaşmacı Ö. Salgın dışı durumlarda dışkıda genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinin prevalansının saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;38:126-31.
31. Gülay Z, Terek G, Eraç B. High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of Enterobacteriaceae in Turkey. 14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Kongre Kitabı 2004;187.

#### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Mümtaz GÜRAN

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
01330, Adana-Türkiye

E-posta: mumtazguran@gmail.com