

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının GSBL Genlerinin Araştırılması

Investigation of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains

Abdullah BEKTAŞ¹, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU², Nafia Canan GÜRSOY³, Mustafa BERKTAŞ⁴,
Bilge Sümbül GÜLTEPE⁵, Mehmet PARLAK⁶, Barış OTLU³, Mehmet Sait TEKEREKOĞLU³

¹Bursa Mustafa Kemalpaşa Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Bursa, Türkiye

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Van, Türkiye

³İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

⁴Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Van, Türkiye

ÖZET

Giriş: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Enterobacteriaceae üyeleri tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Bu çalışmada yaklaşık dört yıllık süre içinde izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL direnç genlerinin saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Ocak 2008-Ekim 2012 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve GSBL ürettiği saptanan 100 *E. coli* ve 100 *K. pneumoniae* suşu bu çalışmaya alınmıştır. Suşların tanımlanması klasik bakteriyolojik yöntemler ve BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize tanımlama cihazı kullanılarak yapılmıştır. Suşların CTX-M, TEM, SHV, VEB, GES, PER ve OXA beta-laktamaz genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır.

Bulgular: *K. pneumoniae* suşlarının beta-laktamaz genleri sırasıyla; CTX-M %99, SHV %91, TEM %71, OXA-10 grup %10 ve OXA-2 grup %5 oranında bulunmuştur. *E. coli* suşlarında CTX-M %92, TEM %70, SHV %21 ve OXA-2 grup %3 oranında bulunmuştur. *E. coli* suşlarında GSBL direnç geni saptanan 98 suşta yalnız CTX-M %25.5 (25/98); sadece TEM pozitif olanlar %2 (2/98) ve sadece SHV pozitif olanlar %2 (2/98) olarak saptanmıştır. *K. pneumoniae* suşlarında ESBL direnç geni saptanan 100 suşta yalnız CTX-M %3 (3/100) oranında bulunmuştur. Diğer direnç genlerinin tek başına bulunduğu herhangi bir suş saptanmamıştır. Çalışmamızda taradığımız GES, VEB ve PER türü beta-laktamaz genleri ise hiçbir suşta saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, GSBL üreten suşlarda CTX-M yüksek oranda bulunmuştur. Bunun olası nedeninin CTX-M türü genlerin gösterdiği hızlı yayılım özelliği olduğu düşünülmüştür. GSBL genlerinin tanımlanması direnç epidemiyolojisinin ortaya konulması, uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve önleyici tedbirlerin doğru planlanması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; CTX-M; TEM; Beta-laktamaz

SUMMARY

Investigation of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains

Abdullah BEKTAŞ¹, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU², Barış OTLU³, Mustafa BERKTAŞ⁴, Bilge Sümül GÜLTEPE⁵,
Mehmet PARLAK⁶, Mehmet Sait TEKEREKOĞLU⁷

¹ Microbiology Laboratory, Bursa Mustafa Kemalpaşa State Hospital, Bursa Turkey

² Clinic of Medical Microbiology, Yuzuncu Yil University Health Research and Practice Hospital, Van, Turkey

³ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Inonu, Malatya, Turkey

⁴ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul, Turkey

⁵ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Bezm-i Alem Vakif, Istanbul, Turkey

⁶ Clinic of Medical Microbiology, Van Training and Research Hospital, Van, Turkey

⁷ Clinic of Medical Microbiology, Inonu University Health Research and Practice Hospital, Malatya, Turkey

Introduction: Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* is an important health problem all over the world. In this study, it was aimed to determine the ESBL genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated for approximately four-year period.

Materials and Methods: A total 100 ESBL-producing *E. coli* and 100 ESBL-producing *K. pneumoniae* strains which were isolated between January 2008 and October 2012 were included into this study. The strains were identified using classical bacteriologic methods and BD Phoenix (Becton Dickinson, US) automatized bacterial identification device. CTX-M, TEM, SHV, VEB, GES, PER and OXA beta-lactamase genes were analyzed with the PCR method.

Results: The beta-lactamase genes detected in ESBL-positive *K. pneumoniae* strains were as follows: 99% for CTX-M, 91% for SHV, 71% for TEM, 10% for OXA-10 group, and 5% for OXA-2 group. In *E. coli* strains, the prevalence of CTX-M was 92%; TEM was 70%, SHV was 21%, and OXA-2 group was 3%. CTX-M alone was found to be positive in 25 of the 98 (25.5%) in *E. coli* strains; TEM alone was found to be positive in 2 of 98 (2%) and SHV alone was found in 2 of 98 (2%). CTX-M alone was found positive in 3 of 100 (3%) *K. pneumoniae* strains. No other resistance genes alone were found in the strains. No GES, VEB and PER-producing strains were determined in this study.

Conclusion: In the study, high prevalence of CTX-M beta-lactamase was found in ESBL-producing strains. It was thought that the high potential of mobility with CTX-M genes was the most possible reason for this result. Determination of ESBL genes will be useful to understand resistance epidemiology, develop effective therapeutic strategies, and plan the appropriate preventive measurements.

Key Words: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Extended spectrum beta-lactamase; TEM; CTX-M; Beta-lactamase

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri çoğunlukla plazmidlerce kodlanırlar ve sefotaksim, seftriakson, seftazidim gibi oksimino sefalosporinleri ve aztreonam gibi monobaktamları hidrolize ederler. Bu enzimler, çoğunlukla *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* başta olmak üzere neredeyse tüm *Enterobacteriaceae* ailesinde ve nonfermentatif bakterilerde görülmekte olup, bazı türleri beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olur^[1].

GSBL enzimlerinden TEM türü beta-laktamazlar *Klebsiella pneumoniae*'da sıklıkla saptanmış olma-

sına karşın diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *Pseudomonas*'larda da tespit edilmiştir^[2]. TEM-1 beta-laktamazlar ampisilin başta olmak üzere karbenisilin, oksasilin ve sefalotini hidrolize edebilir; ancak geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı afiniteleri zayıftır^[3].

SHV-1 beta-laktamazlar *K. pneumoniae*'larda en yaygın olarak bulunan türdür. Bu enzimin *K. pneumoniae*'dan diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine geçişinin plazmid kaynaklı olduğu düşünülmektedir^[3]. Son yıllarda CTX-M olarak adlandırılan plazmid aracılı GSBL'lerin 1989 yılında Almanya'da

bulunduktan sonra hızla ve giderek artan yoğunlukta dünyaya yayıldığı saptanmaktadır. Bu enzim, sefotaksime karşı gösterdiği yüksek hidrolitik aktivitesi nedeniyle CTX-M adı verilmiştir^[4]. Bazı bakterilerde CTX-M ve SHV-tipi GSBL'ler veya CTX-M ve AmpC-tipi beta-laktamaz GSBL'ler birarada bulunabilir. Bu da antibiyotiklere karşı olan direnç durumlarını değiştirebilir^[3,5].

OXA direnç geni oksasilini hidroliz etme yeteneklerinden dolayı OXA ismini almıştır. OXA beta-laktamazlar çoğunlukla *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunur, ancak diğer birçok gram-negatif bakterilerde tespit edilmiştir. En yaygın tipi olan OXA-1 *E. coli* izolatlarında %10 oranında bulunmuştur^[3,4].

PER-1 beta-laktamazların Türkiye'de *Acinetobacter baumannii* izolatlarının %46'sında bulunduğu ve seftazidim direncinin %60'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir^[5]. PER beta-laktamazlar TEM ve SHV tipi GSBL'lerle %25 ile %27 arasında homoloji gösterir^[3].

VEB-1 direnç geni PER-1 ve PER-2 ile benzer homolojiye sahiptir. Seftazidim, sefotaksim ve aztreonam karşı yüksek düzeyde direnç gösterir. Klavulanik asitle inhibe olur.

GES direnç geni, 1998 yılında Fransa'da bir çocuk hastadan izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda gösterilmiştir^[6]. Şimdiye kadar 22 GES türü beta-laktamaz direnç geni tespit edilmiştir. GES-1 beta-laktamazlar penisilinleri, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri ve seftazidimi hidrolize eder. Fakat aztreonam, sefamisin ve karbapenemleri hidrolizi etmeleri düşüktür^[7].

Ülkemizde GSBL oranlarının yüksek olmasına karşın bu enzimlerin araştırılması üzerine fazla çalışma bulunmamaktadır. Böylece hastanemizde ve bölgemizde ilk olarak yapılacak olan bu çalışma ile *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL direnç genlerinin moleküler yöntemlerle saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Örneklerin Toplanması, İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yapılması

Laboratuvarımıza Ocak 2008-Ekim 2012 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve GSBL üreten toplam 100 *E. coli* ve 100 *K. pneumoniae* suşu bu çalışmaya dahil

edildi. Toplanan suşlar çalışma başlayıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Çalışmada bu suşların Brain Heart İnfüzyon Agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) besiyerlerine ekimleri yapıldı. 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İdentifikasyonu konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistem tarafından (Phonex¹⁰⁰ Becton Dickison, US) yapıldı. GSBL tayininde Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ve yine aynı otomatize sistem kullanıldı. GSBL direnç genlerinin belirlenmesi için PCR yöntemi uygulandı.

Suşların antibiyogramları aynı otomatize sistem panellerinde ve bu panellerde olmayan antibiyotikler "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşları kullanıldı. Phonex¹⁰⁰ panellerinde olmayan antibiyotikler CLSI kriterlerine göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle ticari antibiyotik diskleri seftriakson (CRO 30 µg, Oxoid, İngiltere) ve seftazidim (CAZ 30 µg, Oxoid, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar CLSI'nin önerdiği yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi.

Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile GSBL Üretiminin Doğrulanması

Bakterilerin 0.5 McFarland yoğunlukta süspansiyonları hazırlandı ve 100 mm'lik Mueller Hinton Agar (Oxoid, İngiltere) plaklara pamuklu silgiç yardımıyla ekim yapıldı. Plağın ortasına amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), etrafına seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve seftriakson (30 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri aralarındaki uzaklık merkezden merkeze 25 mm olacak



Resim 1. Çift disk sinerji testi pozitif örnek.

şekilde yerleştirildi (Resim 1). Plaklar 35°C'de 18 saat inkübasyonun sonunda değerlendirildi. Amoksisilin/klavulanik asit ile diğer antibiyotikler arasında sinerjinin olması veya amoksisilin/klavulanik asit diskine doğru genişleme olması durumunda sus GSBL pozitif olarak değerlendirildi.

GSBL Direnç Genlerinin Araştırılması

GSBL pozitif *E. coli* ve *K. pneumoniae* suslarında direnç genlerinin araştırılması PCR yöntemiyle, görüntülenmesi jel elektroforezi yöntemiyle yapıldı.

Suşların DNA Ekstraksiyonu

Çalışmamızda Mueller Hinton agara ekimi yapılan suslar 35°C'de 18-24 saat inkübasyonun sonrasında plaktan koloniler eküvyonla toplanarak 500 µL AVE Elution Buffer (Qiagen GmbH, Almanya) bulunan tüplere konuldu. DNA ekstraksiyonu için otomatize QIA-symphony SP/AS instruments (Qiagen GmbH, Almanya) sistemi kullanıldı. Ekstraksiyona alınacak örnek miktarı 200 µL olarak belirlendi. Son hacim 85 µL olacak şekilde sulandırıldı ve çalışmaya kadar -20°C'de saklandı.

PCR ile Hedef Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

PCR amplifikasyon mastermiks protokolu: 12.5 µL TopTaq Master Mix Kit (Qiagen GmbH, Almanya), 2.5 µL CoralLoad (Qiagen GmbH,

Almanya), 7 µL distile su, 0.5 µL Primer F (10 pmol/µL), 0.5 µL Primer R (10 pmol/µL) Qiagility sıvı denetim sistem (Qiagen GmbH, Almanya) robotu kullanılarak 23 µL mastermiks karışımı oluşturuldu. Toplam karışım 25 µL olacak şekilde 23 µL mastermiks ve 2 µL bakteri DNA ekstraksiyon ürünleri Qiagility (Qiagen GmbH, Almanya) robotu kullanılarak 96-well optical reaction plate (Abbott, Singapur) amplifikasyon tüplerine dağıtıldı.

Klinik örneklerden izole edilen 100 *E. coli* ve 100 *K. pneumoniae* susundan elde edilen ekstraksiyon ürünleri Kiratisin ve arkadaşları tarafından tanımlanan primerler ile amplifikasyon işlemi için kullanıldı (Tablo 1)^[8].

Her bir gen bölgesi için, toplam karışım 25 µL olacak şekilde 23 µL mastermiks ve 2 µL bakteri DNA ekstraksiyon ürünleri amplifikasyon tüplerine dağıtılıp GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/USA) cihazına yüklendi.

Amplifikasyon sonrası *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-2 grup, *bla*OXA-10 grup, *bla*VEB, *bla*PER ve *bla*GES gen bölgelerinin varlığının belirlenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elektroforez sonunda görüntüleme için "Gel logic 2200 imaging system" (ayrım gücü 1708 x 1280 pixel, Kodak Company. NA. USA) kullanılarak DNA bantları incelendi (Resim 2). Elde edilen DNA bantları gen bankasından alınan gen

Tablo 1. GSBL genlerinin saptanmasında kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri

Hedef GSBL	Primer	Dizi	Baz çifti
<i>bla</i> CTX-M	CTX-M-F CTX-M-R	TCTCCAGAATAAGGAATCCC CCGTTCCGCTATTACAAAC	909
<i>bla</i> TEM	TEM-F TEM-R	TCCGCTCATGAGACAATAACC TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	931
<i>bla</i> SHV	SHV-F SHV-R	TGGTTATGCGTTATATTGCGCC GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	868
<i>bla</i> OXA-2	OXA-2-F OXA-2-R	AAGAAACGCTACTCGCCTGC CCTCAACCCATCCTACCC	478
<i>bla</i> OXA-10	OXA-10-F OXA-10-R	GTCTTTCGAGTACGGCATT ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	720
<i>bla</i> VEB	VEB-F VEB-R	GATAGGAGTACAGACATATG TTTATTCAAATAGTAATTCCACG	914
<i>bla</i> PER	PER-F PER-R	ATGAATGTCATCACAAAATG TCAATCCGGACTCACT	927
<i>bla</i> GES	GES-F GES-R	ATGCGTTCATTCACGCAC CTATTTGTCGGTGCTCAGG	864

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

büyükliklerine uygun yerlerde görülen bantlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Devamlı değişkenler ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edilirken, kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede ki-kare testi yapıldı. Hesaplamalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 100 *K. pneumoniae* suşunun %39'u pediatri, %33'ü yoğun bakımdan izole edilen suşlardır ($p < 0.001$). Çalışmaya en sık %45 ile idrar kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşları dahil edilmiştir ($p < 0.001$).

Çalışmaya dahil edilen 100 *E. coli* suşunun %56'sı pediatri kliniğinden izole edilen suşlardır ($p < 0.001$). Çalışmaya dahil edilen *E. coli* suşlarının %83'ü idrar kültürlerinden izole edilmiştir ($p < 0.001$).

Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan *K. pneumoniae* suşlarına karşı en etkili antibiyotik imipenem ve meropenem (%100) olarak bulunmuştur. Sefazolin, sefotaksim ve seftriakson hiçbir suшта duyarlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). *E. coli* suşlarında ise en duyarlı antibiyotik imipenem ve meropenem (%100) olup, sefazolin, sefotaksim ve seftriakson hiçbir suшта duyarlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

K. pneumoniae suşları; meropenem, imipenem, sefoksitin ve amikasinde sırasıyla %100, %100, %90 ve %67 ile en yüksek duyarlılığa, sefazolin, sefotaksim, seftriakson ve aztreonamda sırasıyla %99, %99, %99 ve %94 ile en yüksek dirence sahiptir.

E. coli suşları ise meropenem, imipenem, amikasin ve sefoksitine sırasıyla %100, %100, %96 ve %77 ile en yüksek duyarlılığa, sefazolin, sefotaksim, seftriakson ve sefepime sırasıyla %100, %99, %99 ve %87 ile en yüksek dirence sahiptir.

ÇDST Sonuçları

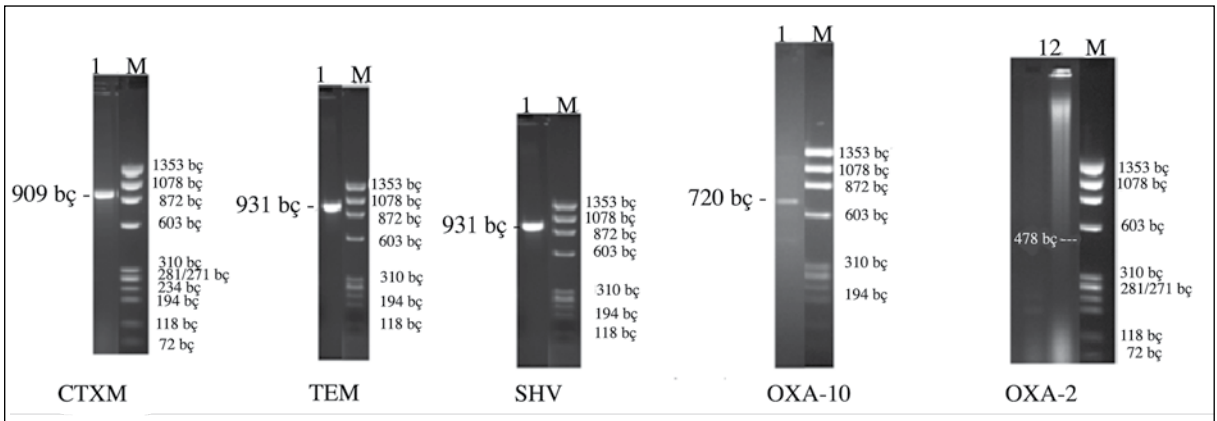
Otomatize sistem tarafından GSBL olarak değerlendirilen iki *E. coli* suşu ÇDST'de GSBL negatif olarak bulunmuştur. Bu suşlara yapılan PCR sonucunda iki suшта da GSBL direnç geni bulunmuştur.

PCR yöntemiyle GSBL geni araştırılan *K. pneumoniae* suşlarının beta-laktamaz gen oranları CTX-M %99, SHV %91, TEM %71, OXA-10 grup %10 ve OXA-2 grup %5'tir. *E. coli* suşlarında CTX-M %92, TEM %70, SHV %21 ve OXA-2 grup %3 oranında bulunmuştur.

Fenotipik yöntemlerle GSBL-pozitif saptanan iki *E. coli* suşunda ise çalışılan GSBL direnç genlerinden hiçbirisi bulunamamıştır.

K. pneumoniae suşlarında GSBL direnç geni saptanan 100 suшта yalnız CTX-M %3 oranında bulunmuştur. Diğer direnç genlerinin tek başına bulunduğu suş yoktur. Suşların gen dağılım oranları Tablo 2'de gösterilmiştir.

E. coli suşlarında GSBL direnç geni saptanan 98 suшта yalnız CTX-M pozitifliği %17, sadece



Resim 2. Polimeraz zincir reaksiyonlarının jel elektroforez sonuçları.

Tablo 2. *Klebsiella pneumoniae* suşlarının beta-laktamaz gen dağılım oranları

PCR yöntemiyle GSBL tespit edilen beta-laktamaz genleri	Beta-laktamaz geni çalışılan izolat sayısı (n= 100)
CTX-M	99 (%99)
SHV	91 (%91)
TEM	71 (%71)
TEM ve CTX-M	6 (%6)
TEM ve SHV	1 (%1)
TEM/SHV/CTX-M	53 (%53)
SHV/OXA-10 grup/CTX-M	4 (%4)
TEM/SHV/OXA-10 grup/CTX-M	6 (%6)
TEM/OXA-2 grup/SHV/CTX-M	5 (%5)
Sadece CTX-M	3 (%3)
Sadece TEM	0
Sadece OXA-10 grup	0
Sadece SHV	0
Sadece OXA-2 grup	0

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

TEM pozitifliği %1 ve sadece SHV pozitifliği %2 olarak bulunmuştur. Suşların gen dağılım oranları Tablo 3'te gösterilmiştir.

TARTIşMA

GSBL'lerin saptanması için kullanılan yöntemler başlıca iki ana gruba ayrılabilir. Birincisi fenotipik yöntemler, ikincisi ise moleküler yöntemler olup GSBL üretiminden sorumlu genleri saptamaya yöneliktir. Klinik tanı laboratuvarları, kolay, maliyet-etkin, yaygın kullanımlı ve çoğu otomatik sistemlerden bağımsız yapılabilirliği nedeniyle fenotipik yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat fenotipik yöntemler GSBL üretiminden sorumlu farklı spesifik gen tiplerini (SHV, TEM ve CTX-M gibi) ayırt edememektedir. Bu nedenle moleküler yöntemlerle GSBL enzim türlerinin tanısı konulabilmektedir^[9]. Bu çalışmada, öncelikle fenotipik yöntemlerle GSBL saptandıktan sonra moleküler yöntemlerle de buna neden olan enzimler tanımlanmıştır.

Tablo 3. *Escherichia coli* suşlarının beta-laktamaz gen dağılım oranları

PCR yöntemiyle GSBL tespit edilen beta-laktamaz genleri	Beta-laktamaz geni çalışılan izolat sayısı (n= 100)
TEM ve CTX-M	56 (%56)
Sadece CTX-M	17 (%17)
SHV ve CTX-M	8 (%8)
SHV ve TEM	2 (%2)
SHV/CTX/TEM	9 (%9)
TEM ve OXA-2 grup	1 (%1)
Sadece TEM	1 (%1)
Sadece SHV	2 (%2)
OXA-2 grup ve CTX-M	1 (%1)
TEM/OXA-2 grup/CTX-M	1 (%1)
Sadece OXA-2 grup	0

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz.

GSBL üreten suşlardan ilk olarak tespit edilen enzimler TEM türü beta-laktamazlardır^[10]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada TEM türü beta-laktamazların *E. coli* suşlarında %79, *K. pneumoniae* suşlarında %70 oranında bulunduğu saptanmıştır^[11]. Yurt dışında yapılan bir çalışmada ise toplumda gelişen idrar yolu infeksiyonlarında *E. coli* suşlarının %58'inde, *K. pneumoniae* suşlarının ise %75'inde TEM türü beta-laktamaz genleri tespit edilmiştir^[12]. Bizim alışmamızda *E. coli* suşlarının %70'inin, *K. pneumoniae* suşlarının ise %71'inin TEM türü GSBL geni taşıdıkları saptanmıştır. Bu sonuçlar dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarla uyumlu görülmektedir.

SHV türü beta-laktamazların öncüsü olan SHV-1 enzimi dünya genelinde en çok *K. pneumoniae*'da bulunmaktadır. Bu enzim genellikle ampisilin, tikarsilin ve piperasilini hidrolize ederken oksiminio-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur. Fakat son yıllarda yapılan esitli çalışmalarda sefotaksim ve seftazidime karşı direnç artışı olduğu grlmektedir^[13]. Bu konuda ülkemizde yapılan bir çalışmada; *K. pneumoniae* suşlarında %92,9, *E. coli* suşlarında ise %25 oranında SHV geni saptanmıştır^[14]. Yurt dışından *E. coli* izolatlarında

SHV pozitifliği %13.5; bir diğerinde ise idrar örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında %43.1 olarak bulunmuştur^[15,16]. Başka bir çalışmada ise değişik klinik örneklerden soyutlanan *K. pneumoniae* izolatında *blaSHV* pozitifliği %19 olarak saptanmıştır^[17]. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi SHV direnc genleri farklı izolatlarda farklı oranlarda tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda *E. coli* suşlarında %21, *K. pneumoniae* suşlarında %91 oranında SHV beta-laktamaz geni saptanmıştır. Bu sonuçlar yukarıdaki çalışmaların bazılarıyla uyumlu olarak bulunmuş olup bölgemizde özellikle *K. pneumoniae*'ya ait SHV direnc geni yüksek olarak saptanmıştır.

CTX-M enzimlerinin ortaya çıkma sebebinin özellikle sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımı olduğu düşünülmektedir^[18]. HİTİT-1 çalışmasında GSBL ürettiği saptanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kan izolatlarında en fazla CTX-M (%71.4) türevi enzimler saptanmıştır^[19]. CTX-M beta-laktamaz sıklığı; etken olarak *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin oluşturduğu başka bir çalışmada (*Enterobacteriaceae* fokal izolatlarında) %96.9, yurt dışında yapılan bir çalışmada ise *E. coli*'de %91.3 ve *K. pneumoniae*'de %87.9 oranında saptanmıştır^[20,21]. Bizim çalışmamızda *E. coli* suşlarının %92'sinin, *K. pneumoniae* suşlarının ise %99'unun CTX-M beta-laktamaz geni içerdiği görülmüştür. CTX-M pozitif suşlarda en etkili antibiyotik grubu olarak karbapenemler gösterilmiş olup, CTX-M pozitif suşların %94.9'u aztreonama, %92.6'sı sefepime ve %53.5'i amoksisilin-klavulanik aside dirençli bulunmuştur ($p < 0.05$). CTX-M pozitif *K. pneumoniae* suşlarının hiçbiri seftriakson ve sefotaksime karşı duyarlı bulunmamıştır ($p < 0.001$). Dünyada ve ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda CTX-M direnc genlerinin hızla yayıldığı ve sık oranda tespit edildiği görülmektedir. Bunun yanında çalışmamızda CTX-M türünün yüksek bulunmasının nedenleri, sefotaksimin bölgemizde yaygın olarak kullanılması ve bu genin sahip olduğu yüksek mobilite olduğu düşünülmüştür.

OXA tipi beta-laktamazlar moleküler sınıf D'de, fonksiyonel sınıflamada ise 2d'de yer alır. Oksasilin ve kloksasilini iyi hidrolize ederken klavulanik asit tarafından inhibisyonları zayıftır. Genellikle dar spektrumlu beta-laktamazlar olup, GSBL olarak OXA-2 ve OXA-10'un türevleri bulunmaktadır^[22]. Ülkemizde, yatan hastalardan izole edilen 76 *E. coli* susunda OXA-2 grup %15.8, OXA-10 grup

%3.9 oranında bulunmuştur^[23]. Hindistan'da yapılan bir çalışmada sınıf 1 ve sınıf 2 integron tespit edilen üç *E. coli* izolatının her üçünde de OXA-2 direnc geni olduğu saptanmıştır^[24]. Bizim çalışmamızda *E. coli* suşlarının %3'ünde OXA-2 grup saptanmış olup, OXA-10 gruba bu suşların hiçbirinde rastlanmamış ve *K. pneumoniae* suşlarında OXA-10 grup %10, OXA-2 grup %5 oranında saptanmıştır.

Bunun yanında çalışmamızda araştırılan GES, PER ve VEB türü beta-laktamazlar başka çalışmalarda pozitif olarak bulunmasına karşın bizim bu çalışmamızda hiçbir susta saptanmamıştır.

Sonuç olarak, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnc oranları giderek artmakta ve çeşitlilik göstermektedir. Bunun sonucunda mikroorganizmalar tarafından geliştirilen bu direnc mekanizmalarının iyi bilinmesi, çoğu zaman antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı gibi görünen çoğu antibiyotiklin klinik etkilerinin olmadığını hatırlanması ve rutin verilecek antibiyotik duyarlılık sonuçlarının her yıl yayınlanan kurallar (CLSI, EUCAST) dikkate alınarak kliniklere bildirilmesi açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı (YYÜ-BAPB) tarafından 99 ID numaralı, 2012-TF-U007 Proje kodu ile desteklenmiştir. Bu nedenle YYÜ-BAPB'ye çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T, Sangüzel Sar N, Gültekin M, Ercis S ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella spp.* suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı. *ANKEM Dergisi* 2010;24(1):34-41.
2. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Res Microbiol* 2004;155(6):409-21.
3. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657-86.
4. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
5. Bush K. The evolution of beta lactamases. *Ciba Found Symp* 1997;207:152-63.

6. Poirel L, Le Thomas J, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron InS2 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(3):622-32.
7. Delbrück H, Bogaerts P, Kupper MB, Rezende de Castro R, Bennink S, Glupczynski Y, et al. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(11):5618-25.
8. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2818-24.
9. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8(3):159-66.
10. Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl 4):1-16.
11. Esen Ş, Eroğlu C, Sünbül M, Leblebicioğlu H. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında TEM ve SHV türü beta-laktamazların sıklığı. *Mikrobiyol Bul* 2001;35:37-43.
12. Martinez P, Garzón D, Mattar S. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. *Braz J Infect Dis* 2012;16(5):420-5.
13. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
14. Öksüz L, Gürler N. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. *Mikrobiyol Bul* 2009;43:183-94.
15. Nakhaei Moghaddam M, Forghanifard MM, Moshrefi S. Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase genes (*bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV) among urinary *Escherichia coli* clinical isolates in Mashhad, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(3):833-9.
16. Rastegar M, Ghalipour M, Mansoursamaei N. Detection of extended spectrum beta-lactamases in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* in relation to *Bla*, *Bla* and *Bla* Gene carriage. *Iran J Public Health* 2012;41(3):127-32.
17. Sedighi M, Halajzadeh M, Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Heidary M, Pirouzi S. Molecular detection of beta-lactamase and integron genes in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* by multiplex polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017;50(3):321-8.
18. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTXM enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):1-14.
19. Gür D, Gülay Z, Arıkan Akan O et al. Türkiye'de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve ESBL tipleri: çok merkezli Hitit surveyansını. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:537-44.
20. Hazirolan G, Mumcuoglu I, Altan G, Özmen BB, Aksu N, Karahan ZC. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and ampc beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a turkish community. *Niger J Clin Pract* 2018;21:81-6.
21. Wienke M, Pfeifer Y, Weissgerber P, Marschal M, Autenrieth IB, Gröbner S. In vitro activity of tigecycline and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from a university hospital in south-western Germany. *Chemotherapy* 2012;58(3):241-8.
22. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):24-38.
23. Görgeç S. (uzmanlık tezi) Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten nozokomiyal *Escherichia coli* izolatlarında beta-laktamaz genleri ve klonal ilişkisinin araştırılması. İnönü üniversitesi. Malatya 2012.
24. Bhattacharjee A, Sen MR, Anupurba S, Prakash P, Nath G. Detection of OXA-2 group extended-spectrum-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(3):703-4.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği,
Van-Türkiye

E-posta: hguducu@hotmail.com