

# ESCHERICHIA COLI VE KLEBSIELLA SPP. SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN TİPLENDİRİLMESİ VE PLAZMİD PROFİL ANALİZİ\*

## TYPING OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA SPP. STRAINS AND ANALYSIS OF PLASMID PROFILES

Lütfiye ÖKSÜZ<sup>1</sup>, Nezahat GÜRLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. (loksuz34@yahoo.com)

### ÖZET

Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinin farklı ünitelerinde (yoğun bakım, hematoloji, onkoloji, yenidoğan, transplantasyon, çocuk cerrahisi) yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden (idrar, kan, trakeal aspirat, apse, boğaz, dren/kateter ucu, plevra/periton sıvısı, beyin omurilik sıvısı, göz) izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten 12 *Escherichia coli* ve 32 *Klebsiella* spp. (28 *K.pneumoniae*, 4 *K.oxytoca*) suşlarındaki beta-laktamaz enzimlerinin araştırılması ve tiplendirilmesi amaçlanmıştır. NCCLS (CLSI) önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinde imipeneme ve meropeneme dirençli suşa rastlanmamıştır. Agar dilüsyon yöntemiyle hem *E.coli*, hem de *Klebsiella* suşlarında sefotaksim için  $MLK_{50}$  ve  $MLK_{90}$  sırasıyla 16 µg/ml ve 64 µg/ml olarak bulunmuştur. GSBL varlığı, disk difüzyon testinde klavulanik asit ve 3. kuşak sefalosporinler arasındaki sinerji ile gösterilmiştir. Suşların tümü, çift disk sinerji ve E-test ile GSBL fenotipi göstermiştir. Yapılan izoelektrik odaklama sonuçlarına göre, suşlarda, pI: 5.4-9.0 arasında 1-4 adet beta-laktamaz bulunmuştur. TEM, SHV ve CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonuçlarına göre *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazların oranı sırasıyla %64.3, %92.9, %64.3 ve %66.7, %25, %83.3 olarak bulunmuştur. ERIC-2 primeri kullanılarak yapılan RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-PCR ile suşların 170-1500 bp arasında bantlara sahip olduğu görülmüş ve *K.pneumoniae*'da 10, *K.oxytoca*'da 3 ve *E.coli*'de 6 grup belirlenmiştir. Konjugasyon ile 44 suşun 31 (%70.4)'inde antibiyotik direnci alıcı suşa aktarılabilmektedir. Plazmid profil analizine göre transkonjugatların 20 (%64.5)'sinin tek bir plazmide (> 48 kb), 11 (%35.5)'inin ise birden fazla plazmide (10-100 kb) sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, hastanemizdeki izole edilen *E.coli* ve *Klebsiella* suşları arasında CTX-M beta-laktamazın, yüksek oranda olduğunu ve hızla yayıldığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** *E.coli*, *K.pneumoniae*, GSBL, PCR, plazmid profil analizi, Türkiye.

\* Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş (Proje no: T-223) ve 21. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi (4-8 Haziran 2006, Antalya)'nde sözlü olarak sunulmuştur.

## ABSTRACT

The aim of this study was to identify the types of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) produced by 12 *Escherichia coli* and 32 *Klebsiella* spp. (28 *K.pneumoniae*, 4 *K.oxytoca*) strains isolated from various specimens (urine, blood, tracheal aspirate, abscess, throat, drain/catheter tips, pleural/peritoneal fluids, cerebrospinal fluid, eye) of patients hospitalized in different units (intensive care, hematology, oncology neonatology, transplantation, pediatric surgery) of Istanbul Medical Faculty Hospital, Turkey. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disc diffusion according to NCCLS (CLSI) guidelines and no resistance to imipenem or meropenem was detected. MICs of cefotaxime and ceftazidime were determined by agar dilution method and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for cefotaxime were found as 16 µg/ml and 64 µg/ml in both *Klebsiella* spp. and *E.coli* strains, respectively. The presence of ESBL was confirmed by double-disc synergy testing and E-test ESBL. All isolates demonstrated an ESBL phenotype by these two methods. Isoelectric focusing (IEF) method demonstrated that the isolates produced 1-4 different beta-lactamases (pls: 5.4-9.0). The rates of TEM, SHV, CTX-M beta-lactamases detected by using specific primers in polymerase chain reaction (PCR), were found as 64.3%, 92.9%, 64.3% for *K.pneumoniae* and 66.7%, 25%, 83.3%, for *E.coli* strains, respectively. The profiles generated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR using ERIC-2 primer revealed several bands, ranging in size from 170 to 1500 bp. According to RAPD-PCR results, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* and *E.coli* strains were separated to 10, 3 and 6 groups, respectively. In the conjugation experiments, 31 of the isolates (70.4%) transferred their resistance genes to recipient *E.coli* strain. Plasmid analysis studies showed that resistance genes were carried on a single plasmid (> 48 kb) in 20 transconjugants (64.5%), while the rest of the strains (35.5%) harbored more than one plasmid, with sizes ranging from 10 to 100 kb. These results showed the rapid emergence and high prevalence of CTX-M type enzymes among *Klebsiella* spp. and *E.coli* strains in our hospital.

**Key words:** *E.coli*, *Klebsiella* spp., ESBL, PCR, plasmid profile analysis, Turkey.

## GİRİŞ

Gram-negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir<sup>1</sup>. Yeni oksimino beta-laktamların (seftazidim, sefotaksim, seftriakson) kullanıma girmesini takip eden yıllarda yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmış ve ciddi enfeksiyonlara yol açmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), geniş spektrumlu beta-laktam ajanlarına direnç gösteren ve genellikle plazmid ile aktarılan enzimler olup son yıllarda büyük önem kazanmışlardır<sup>2</sup>. GSBL'ler, *Enterobacteriaceae*'da ve özellikle *Klebsiella* türlerinde, 3. kuşak sefalosporinlere karşı direncin artış sebebidir. Bunların çoğu, klasik TEM ve SHV tiplerinin mutantlarıdır ve aktif bölgede bir veya daha fazla aminoasit değişikliği ile meydana gelir. Bu değişiklikler, klasik TEM ve SHV enzimleri için stabil olan oksimino-aminotiazolil sefalosporinlerin (seftazidim, sefotaksim, seftriakson) ve monobaktamların (aztreonam) hidrolizine neden olur<sup>1,2</sup>. GSBL'lere en sık *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde, özellikle yoğun bakım üniteleri ve antibiyotiklerin çok kullanıldığı diğer ünitelerde rastlanmaktadır<sup>3,4</sup>. GSBL üreten suşların artan oranlarda izole edilmesi, tedaviyi güçleştirmenin yanı sıra, morbidite ve mortalite artışına da neden olmaktadır. Bu nedenle GSBL üreten suşların saptanması ve tiplendirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı ünitelerde yatan hastalardan izole edilen, GSBL oluşturan *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarının en sık olarak ürettikleri TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazları izoelektrik fokuslama (IEF) ve polimeraz zincir reaksiyo-

nu (PCR) ile araştırılmış, direncin plazmidler aracılığıyla taşınıp taşınmadığı incelenmiş ve olası bir epideminin varlığını göstermek için "Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)" yöntemi kullanılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Suşlar

Çalışmaya, Temmuz 2002-Mart 2004 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarlarına, yoğun bakım, hematoloji, onkoloji, transplantasyon, yenidoğan ve çocuk cerrahisi ünitelerinden gönderilen, yatan hastaların çeşitli örneklerinden izole edilen ve GSBL oluşturan 12 *E.coli*, 28 *K.pneumoniae* ve 4 *K.oxytoca* suşu alındı. Suşlar klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı ve gerek duyulduğunda API ID 32GN (bio-Merieux, Fransa) sistemi kullanılarak sonuçlar doğrulandı.

### Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

NCCLS (yeni adıyla CLSI) önerileri doğrultusunda yapıldı<sup>5</sup>. Kontrol suşu olarak beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotikler için *E.coli* ATCC 35218, diğer antibiyotikler için ise *E.coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı.

### Çift Disk Sinerji Testi

Suşlar, standart disk difüzyon yöntemi kurallarına uyularak Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine yayıldı ve merkeze amoksisilin + klavulanik asit (AMX-CLA; 20/10 µg) ve çevresine merkezler arası uzaklıkları 20 mm olacak şekilde seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirildi. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirildi. AMX-CLA diski çevresindeki seftazidim ve sefotaksim disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonunun, AMX-CLA diskinin doğrusu en az 5 mm genişlemesi GSBL varlığı olarak kabul edildi<sup>5</sup>.

### E-test GSBL Testi

Bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim + klavulanik asit (TZL) içeren E-test şeritleri (AB Biodisk, Solna, İsveç) standart disk difüzyon testinde olduğu şekilde MHA besiyerine yerleştirildi. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra seftazidim MİK değerinin TZL MİK değerine oranı  $\geq 8$  ( $\geq 3$  dilüsyon) ise GSBL oluşturduğu kabul edildi.

### İzoelektrik Fokuslama

Suşların eksprese ettikleri beta-laktamaz genleri, Matthew ve arkadaşlarının<sup>6</sup> belirttiği yöntem ile üretici firma (Biorad, ABD) önerileri doğrultusunda uygulanarak saptandı.

### DNA Ekstraksiyonu ve PCR

GSBL oluşturan suşlarda en sık rastlanan beta-laktamazlar olan *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> genlerinin varlığını araştırmak amacıyla suşlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen bakteri DNA'sı, uygun primerlerin kullanıldığı PCR karışımına ilave edilerek termal döngü cihazında (Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler 480) çoğaltıldı ve agaroz jelde yürütülerek transilüminatörde görüntülendi.

PCR ile 1074 baz çifti (bp) uzunluğundaki *bla*<sub>TEM</sub> geninin çoğaltılması için TEM-F (5'-GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG-3') ve TEM-R (5'-GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC-3') primerleri kullanıldı<sup>8</sup>. PCR karışımı; PCR tamponu (10x), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, her bir dNTP 10 mM, her bir primer 50 pmol, Taq DNA polimeraz 5 U ve DNA 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Her bir döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1.5 dakika uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı olacak şekilde PCR uygulandı.

PCR ile 1016 bp uzunluktaki *bla*<sub>SHV</sub> geninin çoğaltılması için SHV-F (5'-CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3') ve SHV-R (5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3') primerleri kullanıldı<sup>9</sup>. PCR karışımı; PCR tamponu (10x), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, her bir dNTP 10 mM, her bir primer 50 pmol, Taq DNA polimeraz 5 U ve DNA 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Her bir döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 65°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 3 dakika uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı olacak şekilde PCR uygulandı.

PCR ile 544 bp uzunluktaki *bla*<sub>CTX-M</sub> geninin çoğaltılması için CTX-M-A (5'-CGC TTT GCG ATG TGC AG-3') ve CTX-M-B (5'-ACC GCG ATA TCG TTG GT-3') primerleri kullanıldı<sup>8</sup>. PCR karışımı; PCR tamponu (10x), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, her bir dNTP 10 mM, her bir primer 50 pmol, Taq DNA polimeraz 5 U ve DNA 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Her bir döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı olacak şekilde PCR uygulandı.

RAPD-PCR için ERIC-2 primeri (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC-3') kullanıldı<sup>10</sup>. PCR karışımı; PCR tamponu (10x), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, her bir dNTP 10 mM, her bir primer 50 pmol, Taq DNA polimeraz 5 U ve DNA 5 µl olacak şekilde hazırlandı. Her bir döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 40°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı olacak şekilde PCR uygulandı.

### Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri TEM, SHV ve CTX-M için %2, RAPD-PCR için %1'lik agaroz jelde 1 x TAE tamponu içinde yükleme tamponu ile sulandırılarak 100 V'de 1 saat yürütüldü. Transilüminatörle bantlar gözlemlendikten sonra fotoğrafları çekildi.

### Konjugasyon ve Plazmid Profil Analizi

Suşların, sefotaksime (CTX) direnç genlerini alıcı *E.coli* K12 J62-2 (Rif<sup>R</sup>, Laktoz-)'ye aktarım oranları, sıvı faz konjugasyon deneyleri ile incelendi<sup>11</sup>. Alıcı suş; rifampisine dirençli (6 mm), sefotaksime duyarlı (0.06 µg/ml) ve laktoz negatif özellik, verici suşlar; rifampisine duyarlı (17-27 mm), sefotaksime dirençli (2-256 µg/ml) ve laktoz pozitif özellik taşımakta idi.

Transkonjugatlara, Kado ve Liu<sup>13</sup> tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek plazmid profil analizi yapıldı<sup>12</sup>. %0.8 agaroz jelde 0.5 x TAE tamponu içinde yükleme tamponu ile sulandırılarak 100 V'de 3-4 saat yürütüldü. Plazmid büyüklükleri, *E.coli* V517 suşunun plazmidleri ile karşılaştırılarak saptandı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan izolatların 9'u hematoloji, 5'i onkoloji, 6'sı yoğun bakım, 4'ü transplantasyon, 13'ü yenidoğan ve 7'si çocuk cerrahisi ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Suşların 14'ü idrardan, 14'ü kandan, 5'i trakeal aspirattan, 3'ü apsedan, 2'si boğaz salgısından ve birer suş da dren ucu, kateter ucu, plevra sıvısı, periton sıvısı, beyin omurilik sıvısı ve göz sürüntüsünden izole edilmiştir. Suşların 43'ü farklı hastalardan izole edilmiş olup, yalnız bir hastadan biri *E.coli*, biri *K.pneumoniae* olmak üzere iki ayrı GSBL üreten suş izole edilmiştir.

Suşların 8'i yetişkin hastalardan, 36'sı ise yenidoğan ve çocuk hastalardan izole edilmiştir. Dört hastanın kullandığı antibiyotikler hakkında bilgi edinilememiş, bilgi edinilen hastaların genelde GSBL üreten bakterilere etkili antibiyotikler kullandığı, eğer uygun antibiyotik kullanmıyorsa kültür sonucu alındıktan sonra antibiyotiğinin değiştirildiği öğrenilmiştir. Takip edilebilen 34 hastadan 9'u kaybedilmiştir. Hematoloji, onkoloji, yoğun bakım ve transplantasyon servislerinde yatan hastaların tamamının immünsüpresif olduğu saptanmıştır. Yenidoğan servisinde yatan hastaların tümü sepsis nedeniyle yatırılmış ve bilgi alınabilen 6 hastadan 3'ünün kaybedildiği bildirilmiştir. Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalından gelen örnekler ise çeşitli nedenlerle opere olan hastalardan alınmıştır.

*K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları Tablo 1'de belirtilmiştir. *K.oxytoca* suşlarının 2'sinde siprofloksasin ve levofloksasin, 1'inde ofloksasin ve moksisfloksasin, 3 suшта trimetoprim-sülfametoksazol direnci bulunmuştur.

Seftazidim ve sefotaksim için  $MİK_{50}$  ile  $MİK_{90}$  değerleri *Klebsiella* spp. suşlarında sırasıyla, 6 µg/ml ile > 32 µg/ml ve 16 µg/ml ile 64 µg/ml; *E.coli* suşlarında > 32 µg/ml ile > 32 µg/ml ve 16 µg/ml ile 64 µg/ml olarak bulunmuştur.

İzoelektrik fokuslama sonuçlarına bakıldığında, suşların 1-4 arasında bant verdiği (5 suшта 4 bant, 21 suшта 3 bant, 15 suшта 2 bant, 3 suшта tek bant) görülmüştür. Suşların tümü incelendiğinde; 23'ü *K.pneumoniae*, 2'si *K.oxytoca* ve 9'u *E.coli* olmak üzere toplam 34 (%77.3) suşun TEM enzimi ile uyumlu (TEM-1, pl: 5.4; TEM-4, pl: 5.9, TEM-26, pl:5.6) pl: 5.4-6.0 arası bantları gösterdiği belirlenmiştir. On altısı *K.pneumoniae*, biri *K.oxytoca* ve 2'si *E.coli* olmak üzere 19 suşun (%43.2) SHV-3 ile uyumlu olan pl: 7.0 bantı; 8'i *K.pneumoniae*, 2'si *K.oxytoca* ve 4'ü *E.coli* olmak üzere 14 (%32) suşun SHV-1 veya SHV-2 ile uyumlu olan pl: 7.4-7.6 arası bantları; 26'sı *K.pneumoniae*, 3'ü *K.oxytoca* ve 12'si *E.coli* olmak üzere 41 (% 93.2) suşun ise CTX-M ile uyumlu olan pl: 8.0-8.9 arası bantları gösterdiği izlenmiştir.

**Tablo 1. *K.pneumoniae* ve *E.coli* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları**

Bakteri	Direnç (%)													
	CTX	CRO	CAZ	ATM	FEP	TCL	PTZ	GN	TOB	NET	AK	SXT	CIP	LEV
<i>K.pneumoniae</i>	93	93	64	82	43	93	61	29	36	29	11	86	18	18
<i>E.coli</i>	100	92	50	0	50	75	25	42	67	8	0	83	75	75

CTX: Sefotaksim, CRO: Seftriakson, CAZ: Seftazidim, ATM: Aztreonam, FEP: Sefepim, TCL: Tikarsilin-klavulanik asit, PTZ: Piperasilin-tazobaktam, GN: Gentamisin, TOB: Tobramisin, NET: Netilmisin, AK: Amikasin, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin.

TEM, SHV ve CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarına göre *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazlarının oranı sırasıyla %64.3, %92.9, %64.3 ve %66.7, %25, %83.3 olarak bulunmuştur. Yedi suş  $bla_{TEM}$  ve  $bla_{SHV}$  genlerini, 8 suş  $bla_{TEM}$  ve  $bla_{CTX-M}$  genlerini, 6 suş  $bla_{SHV}$  ve  $bla_{CTX-M}$  genlerini, 12 suş ise  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  ve  $bla_{CTX-M}$  genlerini birlikte taşımaktadır. Beş suş sadece  $bla_{SHV}$  genini, 6 suş da sadece  $bla_{CTX-M}$  genini taşımaktadır. *E.coli* suşlarının 3'ünde, daha çok *Klebsiella* suşlarında bulunan  $bla_{SHV}$  geni saptanmıştır. Ayrıca *E.coli* suşlarında yaygın olarak bulunan  $bla_{TEM}$  geni, suşların 4'ünde tespit edilmemiştir. *Klebsiella* suşlarında  $bla_{SHV}$  genine sıklıkla rastlanmakta ise de, bu çalışmada, 2 *K.pneumoniae* suşunda  $bla_{SHV}$  geni saptanmamıştır.

ERIC-2 primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR ile suşların 170-1500 bp arasında bantlara sahip olduğu görülmüş ve *K.pneumoniae*'da 10, *K.oxytoca*'da 3 ve *E.coli*'de 6 grup belirlenmiştir (Tablo II).

Çalışılan suşlarda en sık saptanan (*K.pneumoniae*'da %64.3, *E.coli*'de %83.3) beta-laktamaz tipi olan CTX-M oluşturan suşlar arasından rastgele seçilen iki suşa (TR1, *E.coli*-pl: 8.9; YD4, *K.pneumoniae*-pl: 8.4) DNA dizi analizi yapılmış, suşların birbiriyle %100 benzerlik gösterdiği ve her ikisinin de CTX-M-1 grubu (CTX-M-3-like veya CTX-M-5-like) beta-laktamazlar olduğu bulunmuştur. Bu iki CTX-M, birbirinden sadece bir baz farkla ayrıldığından ve PCR ile çoğaltılan bölge, CTX-M-1 grubu beta-laktamazların ayırımını yapmaya yeterli olmadığından, hem bu iki suş için, hem de suşların geri kalanı için ileri çalışmaların ("full length" dizi analizi) yapılması planlanmıştır.

Konjugasyon deneyleri sonucunda, transkonjugatların ampisilin, sefazolin ve sefuroksime dirençli olduğu (direnç genlerinin aktarıldığı), imipenem, meropenem, sefoperazon + sulbaktam, netilmisin, amikasin, siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, moksiflok-

Tablo II. RAPD-PCR ile Tiplendirilen Bakteri Grupları ve Suş Sayıları

<i>K.pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>		<i>E.coli</i>	
RAPD tipi	Sayı	RAPD tipi	Sayı	RAPD tipi	Sayı
Grup 1a	1	Grup 1	1	Grup 1	1
Grup 1b	1	Grup 2a	1	Grup 2	1
Grup 2	3	Grup 2b	1	Grup 3a	5
Grup 3	3	Grup 3	1	Grup 3b	1
Grup 4	3			Grup 4	1
Grup 5	7			Grup 5	2
Grup 6	3			Grup 6	1
Grup 7	4				
Grup 8	1				
Grup 9	1				
Grup 10	1				

sasin ve piperasilin + tazobaktama ise duyarlı olduğu (direncin aktarılmadığı) görülmüştür. Konjugasyon frekansı *K.pneumoniae* suşlarında %78.6 (22/28), *K.oxytoca* suşlarında %25 (1/4), *E.coli* suşlarında ise %66.7 (8/12) olarak bulunmuştur.

Sefotaksim MİK değeri < 2 µg/ml bulunan 5 suştan, seftazidim MİK değeri ≥ 2 µg/ml olan 4 suşa, seftazidim kullanılarak konjugasyon deneyi yapılmış, ancak bu suşlarda direnç aktarımı tespit edilememiştir.

Plazmid profil analizine göre transkonjugatların 20 (%64.5)'sinin tek bir plazmide (> 48 kb), 11 (%35.5)'inin ise birden fazla plazmide (10-100 kb) sahip olduğu saptanmıştır. *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli*'ye ait elde edilen fenotipik ve genotipik özellikler Tablo III, IV ve V'te belirtilmiştir.

**Tablo III. Klebsiella pneumoniae Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri**

Suşlar	İzolasyon tarihi	RAPD Örnek	CAZ grup	CTX MİK	CTX MİK	PCR			IEF pl	Plazmid sayısı		
						TEM	SHV	CTX-M				
YD1	17.9.2002	T	1a	> 32	4	-	+	-	5.4	7.0	8.4	1
YD2	2.1.2003	T	1b	> 32	4	+	+	-	5.6	7.0		2
YD3	3.1.2003	İ	2	> 32	4	-	+	-	6.0		8.0	3
YD4	6.2.2003	K	2	> 32	64	+	+	+	5.4	7.2, 7.4	8.4	1
YD6	21.4.2003	K	3	8	32	+	+	+	5.4	7.4	8.6	1
YD7	22.4.2003	K	2	32	2	+	+	-	5.4	7.0	8.4	-*
YD8	27.5.2003	K	3	6	32	+	+	+	5.4	7.4, 7.6	8.4	1
YD9	2.6.2003	T	4	> 32	2	+	+	-		7.0	8.4	2
YD10	5.6.2003	T	4	> 32	4	+	+	-	5.4	7.0	8.4	1
YD11	27.6.2003	K	4	6	32	+	+	+	5.4			2
YD13	16.8.2003	İ	3	3	32	+	+	+	5.4	7.0	8.4	1
HE1	30.12.2002	K	7	6	256	+	+	+	5.4	7.0	8.4	2
HE3	7.1.2003	İ	8	> 32	256	+	-	+	5.4	7.0	8.4	-*
HE7	25.7.2003	K	5	8	0.06	-	+	+		7.0	8.4	-*
ON1	2.6.2003	İ	6	0.25	16	-	+	+	5.4	6.0, 6.5	8.4	3
ON3	26.6.2003	B	6	1.5	16	-	+	+	5.4	7.0	8.4	1
ON4	19.7.2003	B	6	1.5	16	-	+	+		7.4	8.4	1
TR2	23.4.2003	İ	5	32	4	-	+	-		7.6	8.4	1
YB1	3.11.2002	İ	9	2	32	+	+	+	5.4	7.4, 7.6	8.4	1
YB2	6.2.2003	BOS	7	> 32	64	+	+	+	5.4	7.0	8.9	1
YB4	26.9.2003	G	7	4	32	+	+	+	5.4	7.4	8.4	1
YB6	27.11.2003	Pr	10	32	64	+	-	+	5.4	7.0	8.9	2
ÇC1	22.7.2002	Kt	5	> 32	64	+	+	+	5.4	7.0	8.4	2
ÇC2	12.12.2002	İ	5	> 32	4	+	+	-	6.0		8.0	-*
ÇC3	21.5.2003	A	5	4	32	+	+	+	5.4		8.4	-*
ÇC4	10.9.2003	A	7	4	0.06	-	+	-		7.0		-*
ÇC6	7.10.2003	Pl	5	3	32	-	+	+	5.4	7.0	8.4	1
ÇC7	1.12.2003	A	5	> 32	32	-	+	-	5.4	7.0	8.4	1

\* Konjugatif plazmid saptanmamıştır.

CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, T: Trakeal aspirat, İ: İdrar, K: Kan, B: Boğaz salgısı, A: Apse, Pl: Plevra sıvısı, Pr: Periton sıvısı, Kt: Kateter ucu, BOS: Beyin omurilik sıvısı, G: Göz sürüntüsü; IEF: İzoelektrik fokuslama.

**Tablo IV.** *Klebsiella oxytoca* Suşlarının Belirlenen Fenotipik ve Genotipik Özellikleri

Suşlar	İzolasyon tarihi	Örnek	RAPD grup	CAZ MİK	CTX MİK	PCR			IEF pl	Plazmid sayısı		
						TEM	SHV	CTX-M				
YD12	13.6.2003	T	1	6	32	+	+	+	5.4	7.6	8.4	2
ON5	3.11.2003	İ	2a	0.50	1	-	-	+		7.0	8.4	-*
TR4	19.11.2003	İ	2b	2	1	-	-	+		7.6		-*
HE6	7.7.2003	K	3	1.5	2	-	-	+	5.4	6.0	8.4	-*

\* Konjugatif plazmid saptanmamıştır.

CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, T: Trakeal aspirat, İ: İdrar, K: Kan, IEF: İzoelektrik fokuslama.

**Tablo V.** *E.coli* Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri

Suşlar	İzolasyon tarihi	Örnek	RAPD grup	CAZ MİK	CTX MİK	PCR			IEF pl	Plazmid sayısı		
						TEM	SHV	CTX-M				
YD5	3.2.2003	İ	1	2	16	+	-	+	5.4		8.6	1
HE2	31.12.2002	K	2	> 32	0.06	-	-	+	5.4	7.0	8.4	-*
HE4	7.1.2003	İ	3a	> 32	256	+	-	+	5.4	7.0	8.4	3
HE5	3.3.2003	K	4	1.5	8	+	-	+	5.4		8.4	2
HE8	22.1.2004	K	5	2	16	-	-	+			8.4	-*
HE9	23.1.2004	K	5	> 32	16	+	+	-	5.4		8.0	1
ON2	12.6.2003	K	6	1.5	16	-	+	+		7.4	8.4	3
TR1	31.12.2002	D	3a	> 32	64	+	-	+	5.4	8.0	9.0	2
TR3	14.11.2003	İ	3a	> 32	64	-	-	+		7.4	8.4	-*
YB3	14.7.2003	İ	3a	> 32	32	+	+	-	5.4	7.4	8.4	-*
YB5	13.11.2003	K	3b	> 32	64	+	-	+	5.4		8.4	2
ÇC5	27.9.2003	K	3a	> 32	64	+	-	+	5.4	7.4	8.4	1

\* Konjugatif plazmid saptanmamıştır.

CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, İ: İdrar, K: Kan, D: Dren ucu, IEF: İzoelektrik fokuslama.

## TARTIŞMA

Son yıllarda beta-laktamazların hidrolitik etkisine dirençli yeni beta-laktam antibiyotiklerin geliştirilmesine karşın, muhtemelen bu antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucu yeni beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır<sup>2</sup>. Bu enzimler, geniş bir aktivite spektrumuna sahip olmaları ve sefamisinler dışındaki tüm sefalosporinlere direnç oluşturmaları nedeniyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmıştır<sup>15</sup>. GSBL üreten suşlar giderek artan bir öneme sahiptir. GSBL üreten bakteri oranlarıyla ilgili olarak dünyada farklı bölgeler arasında belirgin farklar vardır. Örneğin, uluslararası bir çalışmada GSBL üreten *K.pneumoniae* en sık (%45) Güney Amerika ülkelerinden bildirilmiş, aynı oran Gü-



neydoğu Asya'da %25, Amerika Birleşik Devletleri'nde %8 olarak saptanmıştır. Ülkemizde ise bu oran *E.coli*'de %13-36 arasında iken, *K.pneumoniae*'de %60'lara varan oranlara çıkabilmektedir<sup>22</sup>. 2002 yılında hastanemizde yapılan bir çalışmaya göre<sup>23</sup>, iki yıllık sürede acil laboratuvarına gelen örneklerden izole edilen suşlarda çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi ile saptanan GSBL oranları, *K.pneumoniae*'de %48, *K.oxytoca*'da %40, *E.coli*'de ise %14 olarak bildirilmiş; genel GSBL oranı ise %28 olarak verilmiştir. Bu suşlar en sık çocuk hastalardan ve çoğunluğu idrar örneğinden (%37) izole edilmiştir.

GSBL'leri kodlayan plazmidler, aynı zamanda başka sınıf antibiyotiklere (aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol vb.) direnci de kodlayabilirler<sup>2,16</sup>. Çalışmamızda *K.pneumoniae* suşlarının 8 (%29)'inde gentamisin ve netilmisin, 10 (%36)'unda tobramisin, 4 (%11)'ünde amikasin, 5 (%17.8)'inde florokinolon ve 24 (%86)'ünde trimetoprim-sülfametoksazol direnci gözlenmiştir. *K.pneumoniae* suşlarının (n= 28) ikisi sefoksitine dirençli, biri de orta dirençli bulunmuştur. *K.pneumoniae*'de sefoksitin direncine ya plazmid aracılı AmpC ve benzeri bir beta-laktamazın üretiminin ya da klavulanik asit etkisini maskeleyen OmpK35 veya OmpK36 gibi bir dış membran proteininin kaybının yol açabileceği belirtilmiştir<sup>2,17</sup>. Bu çalışmada, 4 *K.oxytoca* suşunun 2'sinde siprofloksasin ve levofloksasin, 1'inde ofloksasin ve moksifloksasin, 3'ünde ise trimetoprim-sülfametoksazol direnci bulunmuştur.

*E.coli* suşlarında (n= 12) amikasin direnci saptanmamış, 5 (%42) suşta gentamisin, 8 (%67) suşta tobramisin direnci ve 1 (%8.3) suşta netilmisine orta düzeyde direnç bulunmuştur. *E.coli* suşlarının 9 (%75)'u kinolonlara, 10 (%83)'ü trimetoprim-sülfametoksazol dirençli bulunmuştur. *E.coli* suşlarında aminoglikozid ve kinolonlara olan direncin, *K.pneumoniae* suşlarında bu antibiyotiklere olan dirençten daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Gülay ve arkadaşları<sup>18</sup>, GSBL oluşturan *E.coli* suşlarında trimetoprim-sülfametoksazole direnci %83 olarak saptamış olup, bu çalışmada da benzer sonuç alınmıştır. Aynı suşlarda belirlenen %25 gentamisin direnci, bu çalışmaya göre (%42) daha düşük bulunmuştur.

CTX-M tipi enzimler, genellikle seftazidim ve aztreonama göre sefotaksimi daha etkin bir biçimde hidrolize eder. Bunun sonucunda, bu enzimleri üreten suşlarda sefotaksim MİK değerleri, seftazidim MİK değerlerinden 2-16 kez daha yüksektir<sup>19</sup>. Çalışmamızda da, PCR ile CTX-M ürettiği saptanan suşların 3'ü hariç (bu 3 suşun sefotaksim MİK değerleri 2 µg/ml'den düşüktür) hepsinde sefotaksim MİK değerleri, seftazidim MİK değerlerinden en az 2 katı kadar yüksek bulunmuştur.

İzoelektrik fokuslama (IEF) yöntemiyle elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışılan suşların 35 (%79.5)'inin, IEF ve PCR sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Uyumlu olmayan sonuçlar arasında, PCR ile saptandığı halde IEF ile bant göstermeyen suşların, bu beta-laktamazı içerdiği halde in vitro aktif olmadığı veya ekspresyonunun az olduğu düşünülmüştür. Tam tersi olarak, PCR ile TEM, SHV veya CTX-M beta-laktamazları saptanmadığı halde, IEF ile bu beta-laktamazlara ait olduğu düşünülen pl'larda bant gösteren suşların ise aynı pl'ya sahip başka bir beta-laktamazı taşıyabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada, PCR sonuçlarına göre *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazlarının oranı sırasıyla %64.3, %92.9, %64.3 ve %66.7, %25, %83.3 olarak bulunmuştur. Aktaş ve arkadaşları<sup>24</sup>, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında GSBL varlığını ÇDS, IEF ve PCR ile incelemişler; çoğunluğu idrar örneklerinden izole edilen 35 *E.coli* ve 15 *K.pneumoniae* suşunun ÇDS ile GSBL oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazlarının oranı sırasıyla %47, %73 ve %47 ve %71.4, %3 ve %100 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, TEM ve SHV beta-laktamazlarının oranı beklenen değerlerde saptanmasına karşın, hem *E.coli*, hem de *K.pneumoniae* suşlarındaki CTX-M beta-laktamazlarının yüksek oranları dikkat çekicidir. Son yıllarda CTX-M tipi GSBL'ler, özellikle Güney Amerika, Asya ve Avrupa gibi bazı coğrafi bölgelerde *E.coli* ve *K.pneumoniae*'da en sık rastlanan GSBL'ler olarak karşımıza çıkmaktadır<sup>3</sup>. Örneğin, Tayvan'dan *E.coli* suşlarında %89.7 ve *K.pneumoniae*'da %58.5 olarak bildirilen direnç oranları, İspanya'dan sırasıyla %52.3 ve %12.5; İtalya'dan ise %54.8 ve %12.3 olarak rapor edilmektedir<sup>3</sup>. Çalışmamızda bu tip GSBL'lerin oranı *E.coli* suşlarında %83.3, *K.pneumoniae*'da ise %64.3 olarak bulunmuştur. Edelstein ve arkadaşları<sup>26,28</sup> Rus hastanesinden izole ettikleri 904 suşu (494 *E.coli* ve 410 *K.pneumoniae*) GSBL üretimi açısından incelemişler; 115 suşun CTX-M tipi GSBL taşıdığını, PCR-RFLP ile bunların %93'ünün CTX-M-1, %7'sinin CTX-M-2 olduğunu belirtmişlerdir. PCR ile *E.coli*'de CTX-M pozitifliği %35.9, *K.pneumoniae*'da ise %34.9 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların, bizim sonuçlarımızdan (*E.coli*'de %83.3, *K.pneumoniae*'da %64.3) daha düşük olduğu görülmektedir. Dokuz Eylül Üniversitesinde yapılan bir çalışmada<sup>25</sup>, 3 aylık bir sürede izole edilen GSBL üreten 14 *E.coli* suşunun tamamında CTX-M-3 bulunmuş, bu suşlara IEF yapıldığında suşların pl: 5.4 ve 8.4 olan 2 bant taşıdıkları saptanmıştır.

CTX-M tipi beta-laktamazların CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-45 olmak üzere bilinen 6 alt grubu vardır<sup>3</sup>. Bu çalışmada da rastgele seçilen, CTX-M tipi beta-laktamaz üreten iki suşun CTX-M-1 grubu olduğu saptanmıştır. İstanbul'da yapılan bir çalışmada da, *E.coli* suşlarında %86.8 oranında CTX-M-grup 1 bulunduğu bildirilmiştir<sup>21</sup>.

Bakteri türlerine göre konjugasyon sonuçları incelendiğinde; *K.pneumoniae* suşlarından %78.6 (22/28)'sinin, *E.coli* suşlarından %66.7 (8/12)'sinin ve *K.oxytoca* suşlarından %25 (1/4)'ünün direnç genlerini alıcı suşa aktarabildiği görülmüştür. Toplam suş sayısına göre ise 44 suştan 31 (%70.4)'ünün konjugasyon deneyleri olumlu sonuç vermiştir. Alıcı suşa direnç genlerini aktaramayan suşların konjugatif plazmid taşımadığı düşünülmüştür. Meksika'da yapılan bir çalışmada yenidoğan-yoğun bakım ve bebek ünitesinden izole edilen 184 *K.pneumoniae* suşunda sefotaksim direncinden sorumlu plazmidini tanımlamak için tüm suşlara konjugasyon deneyi yapılmış, 50 suşun 42 (%84)'sinin alıcı *E.coli* suşuna aktarabildiği gözlenmiştir. Konjugasyonla aktarılan sefotaksim direnci %64.3 olarak bulunmuştur<sup>20</sup>. Bizim çalışmamızda ise *K.pneumoniae* suşlarında direnç genleri %78.6 oranında alıcı suşa aktarılabilmemiş ve aktarılan sefotaksim direnci %91 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda konjugasyonla elde edilen transkonjugatlara plazmid profil analizi yapılmış ve toplam 31 suşta (22 *K.pneumoniae*, 8 *E.coli* ve 1 *K.oxytoca*) 4 ayrı plazmid profili saptanmıştır. Bir suşta 4, 3 suşta 3, 7 suşta 2 ve 20 suşta tek plazmid olduğu saptanmıştır. Suşların 20 (%64.5)'sinde aynı büyüklükte (> 48 kb) tek plazmid olduğu görülmüştür. İki plazmidi olan suşların ikinci plazmidini yaklaşık 57 kb büyüklüğünde olmasına rağmen YD3 suşunun 3 plazmidinden 2'sinin ve TR2 suşunun tek plazmidinin çok daha büyük olduğu görülmüştür. HE4 suşunun, yaklaşık 10, 20 ve 23 kb olduğu tahmin edilen üç plazmidini olduğu görülmüştür. Çalışmaya alınan 44 suşun 31 (%70.45)'i plazmid profil analizi ile tiplendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarındaki CTX-M oranının yüksek olması dikkat çekicidir. Suşların büyük bir bölümünde plazmidlerin saptanmış olması, direncin plazmid ile yayılımını doğrular niteliktedir. Ülkemizdeki yüksek GSBL üreten suş oranı dikkate alındığında, bu konudaki moleküler çalışmaların artırılması gerektiği açıktır.

## KAYNAKLAR

1. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl 1): 11-32.
2. Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
3. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl 1): 33-41.
4. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 48 (Suppl 1): 59-64.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. Gür D (Çeviri ed), Onikinci bilgi eki, M100- S12, 2002. Bilimsel Tip Yayınevi, Ankara.
6. Matthew M, Harris AM. Identification of beta-lactamases by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy. J Gen Microbiol 1976; 94: 55-67.
7. Moore DD. Preparation and analysis of DNA, Appendix 2, A.2.5 Supp 35. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al (eds), Current Protocols In Molecular Biology. 1996, John Wiley&Sons, Inc, New York.
8. Acıkgöz ZC, Gulay Z, Bicmen M. CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. Scand J Infect Dis 2003; 35: 503-5.
9. Taşlı H, Bahar H. Molecular characterization of TEM and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 162-7.
10. Paniara O, Platsouka E, Dimopoulou H, Tzelepi E, Miriagou V, Tzouveleki LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. J Chemother 2000; 12: 204-7.
11. Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, Bauernfeind A. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in Sofia, Bulgaria. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 752-5.
12. Johnson AP, Woodford N. Plasmid analysis, pp: 51-62. In: Johnson AP, Woodford N (eds), Molecular Bacteriology. 1998, Humana Press, New Jersey.
13. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 45: 1365-73.
14. Yuan M, Aucken H, Hall LM, Pitt TL, Livermore D. Epidemiological typing of *Klebsiellae* with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 527-39.
15. Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.

16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
17. Melano R, Corso A, Petroni A. Multiple antibiotic resistance mechanism including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *K.pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 36-42.
18. Gulay Z, Bicmen M, Amyes SGB, Yulug N. Beta-lactamase pattern and beta-lactam/clavulanic acid resistance in *E.coli* isolated from fecal samples from healthy volunteers. *J Chemother* 2000; 12: 208-15.
19. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri, s: 13-26. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar. 2004. Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara.
20. Miranda G, Castro N, Leanos B. Clonal and horizontal dissemination of *K.pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 30-5.
21. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, et al. Dissemination of CTX-M beta-laktamase genes carried on Inc FI/II plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1110-2.
22. Akova M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve klinik önemi, s. 85-94, Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (ed), Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri Enfeksiyonları. 2004. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
23. Bülüş M, Gürol Y, Bal Ç. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları: 2000-2002. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2003; 33: 31-4.
24. Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. *E.coli* ve *K.pneumoniae*'da genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların izoelektrik fokuslama ve PCR ile araştırılması. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri-Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. 8-10 Nisan 2004, İstanbul. Program ve Özet Kitabı, s: 160.
25. Gülay Z, Biçmen M, Atay T. Cefotaximase-M type beta-lactamase production in *Escherichia coli* isolated at a university hospital in Turkey. 13<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 10-13 May 2003, Glasgow, UK. Abstract Book, p. 381, P-1564.
26. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and *K.pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3724-32.