

KLEBSIELLA PNEUMONIAE KLİNİK İZOLATLARINDA CTX-M TİPİ BETA-LAKTAMAZLARIN FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF CTX-M TYPE BETA-LACTAMASES IN KLEBSIELLA PNEUMONIAE CLINICAL ISOLATES BY PHENOTYPIC AND MOLECULAR METHODS

Soner TİKVEŞLİ¹, Nural CEVAHİR², İlknur KALELİ²

¹ Silopi Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şırnak.

² Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli. (cevahir@pau.edu.tr)

ÖZET

Son zamanlarda CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'ların *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızla yayıldığı dikkati çekmektedir. Bu çalışmada, *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında CTX-M varlığının fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Ocak 2006-Ocak 2007 tarihleri arasında hastanede yatan (n= 128) ve poliklinik hastalarının (n= 89) çeşitli klinik örneklerinden (152 idrar, 20 balgam, 17 yara yeri sürüntüsü, 13 kan, 9 trakeal aspirat sıvısı, 3 beyin omurilik sıvısı, 3 göz sürüntüsü) izole edilen 217 *K.pneumoniae* suşu alınmıştır. Suşların in vitro antimikrobiyal duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda disk difüzyon metodu ile, sefotaksimaz üretimi ise CT (sefotaksim)/CTL (sefotaksim-klavulanik asit) şeritleri kullanılarak E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle belirlenmiştir. CTX-M gen varlığı ve alt gruplarının belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmış, CTX-M gen pozitifliği saptanan suşlar arasındaki klonal ilişki RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışılan tüm suşlar arasında en yüksek direnç ampisilin (%94) ve sefalotine (%64.5) karşı belirlenmiş, imipeneme karşı direnç saptanmamıştır. E-test ile izolatların %39.6'sında (86/217) pozitiflik tespit edilmiş; yatan hastalara ait izolatların pozitiflik oranı (%87.4), poliklinik hastalarına ait izolatlardan (%12.6) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p< 0.001). PCR yöntemiyle sefotaksimaz pozitif suşların %22.1'inde (19/86) CTX-M gen varlığı belirlenmiş, bunların tümünün CTX-M grup-1 olduğu görülmüştür. CTX-M-1 olarak belirlenen suşlarda en yüksek direnç amoksisilin-klavulanik asit (%94.7) ve netilmisine (%89.5), en düşük direnç ise siprofloksasin (%26.3), trimetoprim/sülfametoksazol (%26.3) ve amikasin (%42.1) karşı saptanmıştır. RAPD sonucuna göre 19 CTX-M-1 izolatında 11 farklı patern tespit edilmiş, en sık rastlanan kümelerin Kp 3 (n= 3), Kp 4 (n= 3) ve Kp 5 (n= 3) olduğu izlenmiştir. Çocuk yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen sekiz suştan beşinin ve çocuk servisindeki beş suştan dördünün aynı bant paternlerini göstermesi, bu birimlerde klonal yayılım olduğunu düşündürmüştür. Sonuç olarak; nosokomiyal *K.pneumoniae* suşlarında beta-laktamaz üretim oranlarının izlenmesi ve enzim tiplerinin belirlenmesinin, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve uygun antibiyotik seçiminde klinisyenleri yönlendirmesi açısından önemli olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*, sefotaksimaz, CTX-M, PCR, RAPD-PCR.

ABSTRACT

Rapid spread of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) between the members of *Enterobacteriaceae* receives attention increasingly all throughout the world. The aim of this study was to investigate the presence of CTX-M type ESBL in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains by phenotypic and molecular methods. A total of 217 non-repetitive *K.pneumoniae* strains isolated from clinical specimens (152 urine, 20 sputum, 17 wound swabs, 13 blood, 9 tracheal aspirate, 3 CSF and 3 conjunctival swab samples) of inpatients (n= 128) and outpatients (n= 89) admitted to Pamukkale University Medical Faculty Hospital, between January 2006 - January 2007, were included to the study. In vitro antimicrobial susceptibilities were determined by disk diffusion technique in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, and CT (cefotaxime)/CTL (cefotaxime-clavulanate) containing E-test strips (AB Biodisk, Sweden) were applied for phenotypic detection of cefotaximase production. PCR was performed for the detection of CTX-M genes and the subgroups, while the clonal relatedness of the CTX-M positive isolates was investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. While imipenem resistance was not detected in any of the isolates, highest rates of resistance were detected for ampicillin (94%) and cephalothin (64.5%) in 217 *K.pneumoniae* strains. Using the E-test 39.6% (86/217) of the isolates were found positive, and CTX-M positivity was significantly higher in the strains isolated from inpatients (87.4%) than outpatients (12.6%) ($p < 0.001$). CTX-M gene was identified in 22.1% (19/86) of the E-test positive isolates. All of the CTX-M positive isolates were identified as CTX-M group-1. The highest resistance rates of CTX-M-1 strains were detected for amoxycillin-clavulanate (94.7%) and netilmicin (89.5%), while the lowest rates were detected for ciprofloxacin (26.3%), trimethoprim/sulphamethoxazole (26.3%) and amikacin (42.1%). RAPD identified 11 different banding patterns among the 19 CTX-M-1 positive isolates, the most frequent clusters being Kp3 (n= 3), Kp4 (n= 3) and Kp5 (n= 3). Five of the 8 isolates from pediatric intensive care unit and 4 of the 5 isolates from other pediatric wards exhibited the same band pattern indicating a possible clonal dissemination. Continuous surveillance of beta-lactamases and the identification of their types in gram-negative enteric bacteria has important clinical impact, since it can often provide valuable information for effective infection control measures and for the choice of appropriate antimicrobial therapy.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, cefotaximase, CTX-M, PCR, RAPD-PCR.

GİRİŞ

Gram-negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı direncinde en önemli mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktamazlar içinde en geniş grubu, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar oluşturmaktadır. GSBL üreten suşların penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyogramda duyarlı bulunabilmeleri ve bu antibiyotiklerin kullanıldığı tedavilerde sorunlarla karşılaşılması nedeniyle, bu enzim üretiminin gösterilmesinin gerekli olduğu bildirilmektedir¹. GSBL'ler hemen hemen tüm enterik bakterilerde tanımlanmış olmasına rağmen, sıklıkla *Klebsiella pneumoniae* suşlarında bulunmaktadır^{2,3}. Büyük çoğunluğu TEM, SHV veya OXA enzimlerinden köken almaktadır. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda CTX-M, PER, VEB gibi genişlemiş spektrumlu enzimlerde de büyük bir artış olduğu görülmektedir¹.

CTX-M enzimi ilk kez 1989 yılında Almanya'da bir *Escherichia coli* suşunda bildirilmiş ve bugüne kadar *Salmonella* spp. başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır¹. CTX-M olarak tanımlanan sefotaksimazlar, substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir. Seftazidim hidrolizi ise klinikte direnç oluşturacak düzeyde değildir. Ayırı-

ca tazobaktamın bu enzimlere karşı inhibitör etkisi, klavulanik asit ve sulbaktama göre daha fazladır. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir⁴.

Günümüzde, CTX-M ailesinde yer alan 40 enzim bulunmaktadır ve bunlar aminoasit dizilerindeki benzerliklere göre CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olarak tanımlanan 5 gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında CTX-M beta-laktamaz varlığının saptanması, grubunun belirlenmesi ve CTX-M pozitif suşlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmaya, Ocak 2006-Ocak 2007 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen poliklinik (n= 89) ve yatan (n= 128) hastalara (129 kadın, 88 erkek) ait çeşitli klinik örneklerden (152 idrar, 20 balgam, 17 yara yeri sürüntüsü, 13 kan, 9 trakeal aspirat sıvısı, 3 beyin omurilik sıvısı, 3 göz sürüntüsü) izole edilmiş olan 217 *K.pneumoniae* suşu alındı. Aynı hastaya ait birden fazla örnek olma durumunda sadece bir örnek çalışmaya dahil edildi. Suşların 58'i çocuk hastalıkları servisinde, 51'i yoğun bakım ünitesinden, 39'u cerrahi servislerden, 29'u dahili servislerden, 24'ü çocuk acil polikliniğinden, 9'u çocuk cerrahisinden ve 7'si acil servisten gönderilen örneklerden izole edildi. Suşların tanımlanması klasik mikrobiyolojik yöntemlerle⁵ yapıldı, gerektiğinde tanımlama için API 20E (bioMerieux, Fransa) kiti kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılığı

Suşların antibiyotik duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı⁶. Test edilen antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Ankara) Tablo 1'de gösterildi. Kontrol suş olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı.

CTX-M Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması

Suşlarda sefotaksimaz varlığı E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla, bir ucunda sefotaksim (CT), diğer ucunda sefotaksim-klavulanik asit (CTL) bulunan E-test şeritleri kullanıldı. %0.85 steril NaCl içinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları, 9 cm çaplı petrilere 4 mm kalınlıkta hazırlanmış Mueller-Hinton besiyerine eküvyonla ekildi. On beş dakika oda ısısında bekletildikten sonra E-test şeritleri yerleştirildi. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. CLSI önerileri⁶ doğrultusunda sefotaksim/klavulanik asit minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerinde, sefotaksim MİK değerine göre 8 kat ve üzerinde azalma olduğunda veya sefotaksim inhibisyon elipsindeki deformasyonlar pozitif, aksi ise negatif olarak kabul edildi. Testlerde negatif kontrol olarak ATCC 25922 *E.coli*, pozitif kontrol olarak ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşu kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile CTX-M Geninin Araştırılması

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde DNA saflaştırma kiti (Fermantas KO512 Genomic DNA Purification Kit, Kanada) kullanıldı ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA amplifikasyonunda kullanılmak üzere, nükleotid dizisi ve ampikon büyüklükleri daha önce belirlenmiş olan üniversal ve grup primer dizileri⁷ Vivantis (Kanada) firmasına sentez ettirildi (Tablo II).

Tablo I. Çalışmada Test Edilen Antibiyotikler ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Toplam Direnç Oranları (n= 217)

Antibiyotik (kısaltma; disk konsantrasyonu)	Direnç oranı (%)
Ampisilin (AMP; 10 µg)	94.0
Sefalotin (KF; 30 µg)	64.5
Amoksisilin-klavulanik asit (AMC; 20/10 µg)	58.9
Sefuroksim (CXM; 30 µg)	52.1
Sefoperazon (CFP; 75 µg)	48.8
Sefotaksim (CTX; 30 µg)	48.4
Seftazidim (CAZ; 30 µg)	48.4
Aztreonam (ATM; 30 µg)	47.5
Tobramisin (TOB; 10 µg)	38.7
Gentamisin (GN; 10 µg)	37.3
Trimetoprim-sülfametoksazol (SXT; 1.25/23.75 µg)	34.6
Netilmisin (NET; 30 µg)	30.9
Sefoksitin (FOX; 30 µg)	23.9
Piperasilin-tazobaktam (TZP; 100/10 µg)	23.5
Amikasin (AK; 30 µg)	12.4
Siprofloksasin (CIP; 5 µg)	11.5
İmipenem (IMP; 10 µg)	0

Tablo II. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Ampikon Büyüklükleri

Primer	Nükleotid dizisi	Ampikon büyüklüğü
CTX-M-UNI-V	5'-CVATGTGCAGYACCAGTAA-3'	585 bp
CTX-M-UNI-R	5'-ARGTGACCAGAAYMAGCGG-3'	
CTX-1-F	5-CCCATGGTTAAAAATCACTG-3	891 bp
CTX-1-R	5-CCGTTTCCGCTATTACAAAC-3	
CTX-2-F	5-ATGATGACTCAGAGCATTCGC-3	893 bp
CTX-2-R	5-TCGCTCCATTATTGCATCA-3	
CTX-8-F	5-ATGTTAATGACGACAGCCTGTG-3	689 bp
CTX-8-R	5-CCGGTTTTATCCCCGACA-3	
CTX-9-25 F	5-GATTGACCGTATTGGGAGTTT-3	864 bp
CTX-9-25 R	5-TATTGAGAGTTACAGCCCTTCG-3	

Toplam 50 µl olan amplifikasyon tüpünün içeriği; 5 µl 10X PCR tamponu, 2 mM dNTP karışımı 1.25 µl, 25 mM MgCl₂'den 5 µl, Taq polimeraz 0.5 µl, 50 pmol her bir primerden 1 µl, nükleaz içermeyen distile su 34.25 µl ve bakteri DNA'sı 2 µl olacak şekilde hazırlandı. Termal döngü cihazı (Bio-Rad, ABD), kullanılan primere uygun olacak şekilde programlandı⁷. Ünlversal primer için amplifikasyon programı; başlangıç denatürasyonu 95°C de 5 dakika, denatürasyon 94°C'de 45 saniye, primer bağlanması 61°C'de 45 saniye, primer uzaması 72°C'de 45 saniye, toplam 35 döngü, ek uzama 72°C'de 10 dakika olarak ve grup primerleri için amplifikasyon programı; başlangıç denatürasyonu 95°C'de dakika, denatürasyon 94°C'de 50 saniye, primer bağlanması 50°C'de 40 saniye, primer uzaması 72°C'de 60 saniye, toplam 30 döngü, ek uzama 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR

CTX-M pozitif olarak saptanan suşlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasında, ERIC-2 (Metis Biyoteknoloji, Ankara) primeri kullanılarak RAPD uygulandı⁸. Toplam 50 µl olan amplifikasyon tüpünün içeriği; 5 µl 10X PCR tamponu, 2 mM dNTP karışımı 10 µl, 25 mM MgCl₂'den 5 µl, Taq polimeraz 1 µl, 50 pmol her bir primerden 1.5 µl, nükleaz içermeyen distile su 24 µl ve bakteri DNA'sı 2 µl olacak şekilde hazırlandı. RAPD-PCR için amplifikasyon programı; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika ve 36°C 1 dakika, denatürasyon 94°C'de 1 dakika, primer bağlanması 36°C'de 90 saniye, primer uzaması 72°C'de 3 dakika, toplam 30 döngü, ek uzama 72°C'de 10 dakika olarak uygulandı. Sonuçların değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı ve %2'lik agaroz jel hazırlandı. 150 V'da 20 dakika süreyle elektroforez uygulandı. Jeldeki bantlar görüntüleme sisteminde (Imaging System GEL LOGIC 2200, Kodak) 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri, moleküler ağırlık standardı ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldı. RAPD yöntemiyle elde edilen profiller değerlendirildiğinde, eşit sayıda ve büyüklükte bant varlığı saptanması halinde suşlar birbirinin aynı, iki veya daha fazla sayıda değişik bant saptanması durumunda ise birbirinden farklı olarak kabul edildi⁸.

İstatistiksel Yöntem

Araştırma verilerinin kodlanarak bilgisayarda değerlendirilmesinde "SPSS for Windows Version 11.0" paket programı kullanıldı ve analizler ki-kare testleri (Pearson chi-square, Continuity correction, Fisher's exact test) ile yapıldı. p değerinin < 0.05 olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, tüm *K.pneumoniae* izolatlarının imipeneme duyarlı olduğu saptanmış, en yüksek direnç ampisilin (%94) ve sefalotine (%64.5) karşı belirlenmiştir (Tablo I). İzolatların %39.6'sı (86/217) CT/CTL E-test yöntemiyle pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu izolatların %87.4'ünün yatan hastalardan, %12.6'sının ise poliklinik hastalarından alınan örneklerden izole edildiği görülmüş ve yatan hastalarda saptanan yüksek oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0.001). Beş poliklinik hastasında da, bakteri izolasyonundan önceki 4 ay içinde hastaneye yatış öyküsü olduğu izlenmiştir.

E-test ile pozitif bulunan 86 izolatın 19 (%22.1)'unda CTX-M gen varlığını ifade eden 585 bç büyüklüğünde bant oluşumu saptanmıştır (Resim 1). Bu suşlarda sırasıyla grup-1, grup-2, grup-8 ve grup-9/25 araştırıldığında, suşların tamamının grup-1'de olduğu belirlenmiştir (Resim 2).

Fenotipik ve genotipik olarak CTX-M pozitifliği saptanan suşların kliniklere ve örnek-
lere göre dağılımı ile antibiyotiklere direnç oranları Tablo III'te gösterilmiştir.

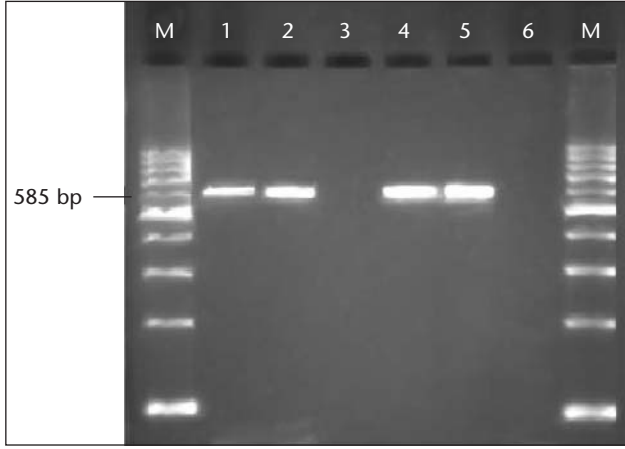
CTX-M grup-1 olduğu belirlenen *K.pneumoniae* suşlarında RAPD-PCR ile klonal ilişki-
nin araştırılması sonunda, oluşan bantlara göre 11 ayrı küme tespit edilmiştir (Resim 3).
Suşlar gösterdikleri bant profillerine, izole edildikleri kliniklere ve tarihe göre sınıflandırıl-
mış; buna göre izolatlar arasında en sık rastlanan kümelerin Kp 3 (n= 3), Kp 4 (n= 3) ve
Kp 5 (n= 3) olduğu saptanmıştır. Çocuk yoğun bakım ünitesindeki 8 suştan 5'inin ve ço-
cuk servisindeki 5 suştan 4'ünün aynı, diğer servislerdeki suşların ise farklı bant patern-
leri gösterdiği izlenmiştir.

Tablo III. CTX-M Pozitif *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Özellikleri

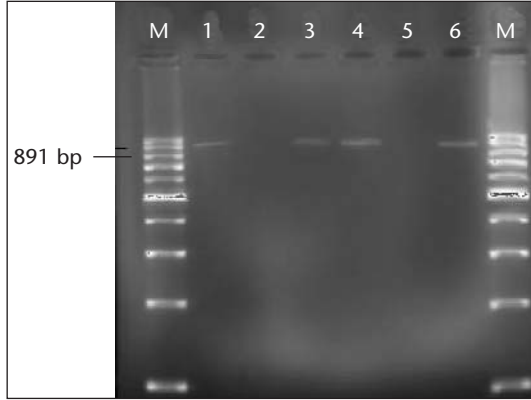
	CTX-M pozitif izolatlar	
	E-test ile pozitif (n= 86)	PCR ile pozitif (n= 19)
Kliniklere göre dağılım n (%)		
Yoğun bakım üniteleri	33 (38.4)	11* (57.8)
Çocuk hastalıkları servisi	26 (30.2)	5 (26.3)
Cerrahi birimler	11 (12.8)	1 (5.3)
Çocuk acil	9 (10.5)	1 (5.3)
Çocuk cerrahi servisi	4 (4.6)	1 (5.3)
Dahili birimler	3 (3.5)	-
Örneklere göre dağılım n (%)		
İdrar	59 (68.6)	11 (57.8)
Kan	9 (10.5)	3 (15.8)
Trakeal aspirat sıvısı	6 (6.9)	3 (15.8)
Balgam	5 (5.8)	1 (5.3)
BOS	3 (3.5)	-
Yara yeri sürüntüsü	3 (3.5)	1 (5.3)
Göz sürüntüsü	1 (1.2)	-
Antibiyotiklere direnç oranı (%)		
AMC	83.9	94.7
Tobramisin	74.7	84.2
Gentamisin	70.1	84.2
Netilmisin	62.1	89.5
Sefoksitin	46.0	57.9
TZP	42.5	63.2
SXT	41.4	26.3
Amikasin	25.3	42.1
Siprofloksasin	18.4	26.3
İmipenem	0	0

* Bu suşların 8'i pediatri yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir.

BOS: Beyin omurilik sıvısı, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, TZP: Tazobaktam-piperasiline, SXT: Trimetoprim-sülfame-
toksazol, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.



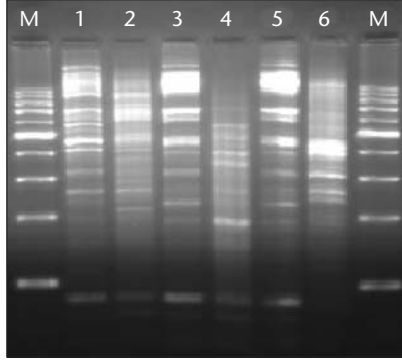
Resim 1. PCR ile CTX-M genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bç'lik moleküler ağırlık standardı; 1: Pozitif kontrol; 3: Negatif kontrol; 2, 4, 5: Pozitif saptanan izolatlara; 6: Negatif saptanan izolat.



Resim 2. PCR ile CTX-M grup 1 genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bç'lik moleküler ağırlık standardı; 1: Pozitif kontrol; 2: Negatif kontrol; 3, 4, 6: Pozitif saptanan izolatlara; 5: Negatif saptanan izolat.

TARTIŞMA

Gerek enfeksiyon etkeni gerekse kolonizan bakteri olarak hasta örneklerinden sıkça izole edilen nozokomiyal *K.pneumoniae* suşları, çoklu antibiyotik direnci göstermekte ve GSBL enzimleri bu izolatlarda yüksek oranda saptanmaktadır^{9,10}. Enfeksiyonların uygun şekilde tedavi edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması için hastanelerde GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatlarının tanımlanması önem taşımaktadır¹¹. GSBL'lerin çoğu klasik olarak TEM ve SHV grubu enzimlerinin mutantları olarak görülmüş, ancak 1995'li yıllardan itibaren özellikle yatan hastalardan izole edilen gram-negatif bakteriler arasında CTX-M beta-laktamaz üretim oranlarında artış olduğu bildirilmiştir^{1,12}. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da, hastane enfeksiyonlarından sorumlu *K.pneumoniae* suşlarında yüksek oranlarda GSBL pozitifliği rapor edilmiştir¹³⁻¹⁶. Bizim çalışmamızda da, poliklinik ve



Resim 3. RAPD-PCR sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. M: 100 bp'lık moleküler ağırlık standardı; 1-6: Çocuk servisinde izole edilen suşlar.

servis hastalarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında CTX-M tipi beta-laktamazların varlığı araştırılmış ve sonuçlarımız, hastanede yatan hastalara ait izolatlarda CTX-M pozitifliğinin (%87.4), poliklinik hastalarına ait izolatlardan (%12.6) anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Çalışmamızda ilginç olarak, PCR ile pozitif bulunan suşların %79'unun (15/19) çocuk hastalara ait olduğu görülmüş (Tablo III), bu durumun çocuklarda kinolon grubu antibiyotiklerin kullanılamaması nedeniyle beta-laktam grubu antibiyotik kullanımının daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ek olarak, çocuk yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen sekiz suştan beşinin ve çocuk servisindeki beş suştan dördünün aynı bant paternlerini göstermesi, bu birimlerde klonal yayılımın varlığını düşündürmüştür.

GSBL pozitif bakteri enfeksiyonlarında karbapenemlere alternatif olabilecek tedavi seçenekleri halen tartışılmakta ve ikinci seçenek olabilecek kinolon grubu antibiyotiklerin etkisi son yıllarda giderek azalmaktadır^{17,18}. Gioia ve arkadaşları¹⁹, GSBL üreten yoğun bakım kökenli *Klebsiella* suşlarının dört yıllık bir dönemde kinolon ve aminoglikozid direncinin 2-3 kat, piperasilin/tazobaktam direncinin ise yaklaşık iki kat arttığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da, *Klebsiella* türlerinde amikasin %61, gentamisine %72, piperasilin/tazobaktam %63 ve siprofloksasine %31 oranında direnç tespit edilmiştir²⁰. Mumcuoğlu ve arkadaşları²¹ ise, GSBL pozitif suşlara karşı en etkili antibiyotiklerin amikasin, imipenem ve siprofloksasin olduğunu ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda izolatların hiçbirisinde imipeneme karşı direnç görülmemiş, PCR ile CTX-M pozitif bulunan suşlarda en düşük direnç oranları siprofloksasin (%26.3), SXT (%26.3) ve amikasin (%42.1) karşı saptanmıştır (Tablo III).

Ülkemizden 2004 yılında bildirilen ilk CTX-M-15 suşu, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan bir hastanın idrarından izole edilen ve TEM ve CTX-M genleri pozitif olarak saptanan bir *E.coli* suşudur²². Dokuz Eylül Üniversitesinde yapılan bir çalışmada da, üç aylık bir sürede izole edilen 14 GSBL pozitif *E.coli* suşunun tamamında PCR ile CTX-M gen varlığı saptanmış, DNA dizi analizi sonunda bunların CTX-M-3 ile benzer olduğu görülmüştür²³. Aktaş ve arkadaşlarının²⁴ çalışmasında, çoğunluğu idrar örneklerinden izo-

le edilen 35 *E.coli* suşunda TEM, SHV ve CTX-M pozitiflik oranları sırasıyla; %71.4, %3 ve %100 olarak saptanmış, bu oranlar 15 *K.pneumoniae* suşu için ise sırasıyla; %47, %73 ve %47 olarak bildirilmiştir. Bu araştırmacılar PCR ile CTX-M pozitif buldukları 12 *K.pneumoniae* ve beş *E.coli* suşunun tamamında dizi analizi ile CTX-M-15 varlığını göstermişlerdir²⁴. Paterson ve arkadaşları²⁵ ise, ülkemizin de içinde bulunduğu yedi ülkedeki 12 hastaneden gönderilen 455 *K.pneumoniae* kan izolatında beta-laktamaz üretimini değerlendirmişler ve fenotipik GSBL üretimini %18 oranında bulmuşlardır. Genotipik çalışmalarda ise bu suşlar arasında en yaygın beta-laktamazın SHV olduğu (%67) görülmüş, Türkiye'ye ait dokuz suşun beşinde PER tipi beta-laktamaz ve bunların ikisinde SHV-2 ve SHV-5 varlığı saptanmıştır²⁵. Araştırmacılar ayrıca, suşların %23.3'ünde CTX-M tipi (CTX-M-2 ve CTX-M-3) beta-laktamaz pozitifliği bildirmişler; daha önce CTX-M bildirilmemiş olan dört ülkede de (Avustralya, Türkiye, Belçika, Güney Afrika) bu beta-laktamazın varlığını göstermişler ve çalışmayı içeren ülkelerin tümünde (ABD hariç) CTX-M pozitifliği saptadıklarını rapor etmişlerdir²⁵. Gür ve arkadaşlarının²⁶ yaptığı altı merkezli bir çalışmada da, *K.pneumoniae* suşlarının %34.6'sının GSBL ürettiği belirlenmiş, bunların %71.4'ünde CTX-M pozitifliği saptanmış ve CTX-M pozitif suşların da CTX-M-1 olduğu bulunmuştur. Bütün bu çalışmalar ülkemizde CTX-M oluşturan suşların yaygın olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda CTX-M pozitiflik oranı PCR ile %23 (19/87) olarak saptanmış ve bu suşların tamamının grup-1'e ait olduğu görülmüştür.

Gülay ve arkadaşlarının²³ yaptıkları çalışmada, CTX-M geni pozitif olan 14 *E.coli* suşunun ERIC-2 primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR ile yedi ayrı patern gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda da ERIC-2 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda suşlar, elde edilen bant benzerliklerine göre gruplandırılmış ve en sık rastlanan grubun Kp 3 (n= 3), Kp 4 (n= 3) ve Kp 5 (n= 3) olduğu saptanmıştır. *K.pneumoniae* suşları arasında grup Kp 3, Kp 4 ve Kp 5'e ait suşların aynı bant sayısına sahip olmaları nedeniyle epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar olduğu, grup Kp 6a ve 6b'nin ise iki bant farklılığı olması sebebiyle yakın ilişkili suşlar olabileceği, bu suşların dışındaki suşların ise birbirile ilişkiz suşlar olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak; tedavisi güç ve pahalı hastane enfeksiyonlarına ve salgınlarına yol açmaları nedeniyle *K.pneumoniae* suşlarında beta-laktamaz enzim üretiminin izlenmesi ve tipinin belirlenmesi, gerekli kontrol önlemlerinin alınması ve uygun antibiyotik seçiminde klinisyenleri yönlendirmesi açısından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47: 273-95.
2. Bush K. Is it important to identify extended spectrum beta-lactamase producing isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 361-4.
3. Coudron PE, Moland S, Sander CC. Occurrence and detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center. J Clin Microbiol 1997; 35: 2593-6.
4. Gür D. ESBL'lerin genel özellikleri ve ESBL tipleri, s: 5-11. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar. 2004. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
5. Koneman EW, Allen SD, Jonda WM, Schreckenber PC, Winn WC Jr. *Enterobacteriaceae*, p: 211. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6th ed. Lippincott Company, Philadelphia.

6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. (Gür D, Çeviri editörü), Onsekizinci Bilgi Eki. M100-S18, 2008. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul.
7. Jeong SH, Bae IK. Dissemination of transferable CTX-M-type extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in Korea. J Applied Microbiol 2005; 98: 921-7.
8. Aktaş Z, Kipritçi Ö. Transplantasyon ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının PAPD-PCR yöntemiyle tiplendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36: 88-93.
9. Podscun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 589-603.
10. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1697-704.
11. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. FLORA 2001; 6: 3-9.
12. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 451-4.
13. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. "Extended spectrum β -lactamases" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. Enfeksiyon Derg 1995; 9: 93-8.
14. Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen enfeksiyonlardan izole edilen *Klebsiella* türlerinde antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. ANKEM 1996; 10: 14-8.
15. Gülay Z, Biçmen MK, Yuluğ N. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanmasında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi. ANKEM 1998; 12: 514-21.
16. Akçam FZ, Gönen I, Kaya O, Yaylı G. Hastane enfeksiyonu etkeni çeşitli gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. Klimik Dergisi 2004; 17: 47-50.
17. Kim YK, Pai H, Lee HJ. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1481-91.
18. Balkan İl, Gençer S, Batirel A, Özer S. Florokinolonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin analizi. FLORA 2005; 10: 65-73.
19. Gioia SB, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 183-9.
20. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 183-9.
21. Mumcuoğlu I, Gündüz T, Baydur H. *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM 2004; 18: 9-11.
22. Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal C, Bauernfeind A. Detection of CTX-M-15 type extended spectrum beta-lactamase in an *Escherichia coli* strain isolated from the urine sample of a hospitalized patient. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 421-9.
23. Gülay Z, Biçmen M, Atay T. Cefotaximase-M type beta-lactamase production in *Escherichia coli* isolated at a university hospital in Turkey. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 May 2003, Glasgow, UK. Congress and Abstract Book, P-1564.
24. Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. *E.coli* ve *K.pneumoniae*'de genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların "isoelectric focusing" ve PCR ile araştırılması. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri-Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. İstanbul 2004. Program ve Özet Kitabı, P-19.
25. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM. Extended spectrum beta-lactamases in *K.pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M type beta lactamases. Antimicrob Agent Chemother 2003; 47: 3554-60.
26. Gür D, Gülay G, Arkan Akan Ö, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 537-44.