

# GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEEN GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDE $bla_{CTX-M}$ BETA-LAKTAMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## DETECTION OF $bla_{CTX-M}$ BETA-LACTAMASE GENES IN EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Banu BAYRAKTAR<sup>1</sup>, Buket TOKSOY<sup>1</sup>, Emin BULUT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul. (banu\_bayraktar@yahoo.com)

### ÖZET

Geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarında, CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin yaygınlaşması, plazmid ile aktarılan antibiyotik direncinin hızlı ve global yayılımına en dikkat çekici örnektir. Bu çalışmaya, Şubat-Temmuz 2009 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1640 *Enterobacteriaceae* suşu arasından GSBL ürettiği saptanan ardışık 200 (%12) izolat (167 idrar, 11 yara, 7 bronkoalveoler lavaj, 3 periton sıvısı, 2 beyin omurilik sıvısı, 2 biyopsi, 2 trakeal aspirat, 2 konjunktiva, 1 apse, 1 kateter) dahil edilmiştir. GSBL üreten 200 suşun 141 (%70.5)'i *Escherichia coli*, 51 (%26)'i *Klebsiella pneumoniae*, 5 (%2.5)'i *Enterobacter spp.*, 1 (%0.5)'i *Citrobacter freundii*, 1 (%0.5)'i *Klebsiella oxytoca* ve 1 (%0.5)'i de *Proteus mirabilis* olarak tanımlanmıştır. GSBL pozitiflik oranı toplum kökenli 123 izolatta %11, hastane kökenli 77 izolatta ise %13 olarak saptanmış, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Bu suşlarda  $bla_{CTX-M}$  beta-laktamaz genlerinin prevalansı, CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 grupları ile CTX-M-8 ve CTX-M-25 gruplarını saptayabilen iki farklı genel primer seti (sırasıyla; CTX-MA1 ve CTX-MA2 ile CTX825-F ve CTX825-R) kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda, suşların %83.5 (167/200)'inde  $bla_{CTX-M}$  genleri saptanmış; toplum ve hastane kökenli suşlarda CTX-M üretme oranları sırasıyla %86.2 (106/123) ve %79.2 (61/77) olarak belirlenmiş ve oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). CTX-M üreten 167 suşun 132'sinin *E.coli*, 35'inin ise *Klebsiella spp.* izolatları olduğu ve bunların CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 gruplarından enzim eksprese ettiği gözlenmiştir. CTX-M-8 ve CTX-M-25 gruplarından enzim üreten suşa rastlanmamıştır. Toplum ve hastane kökenli GSBL üreten *E.coli* suşlarında CTX-M üretme oranları sırasıyla %92.5 ve %95.7; GSBL üreten *Klebsiella spp.* suşlarında ise %67.8 ve %66.7 olarak saptanmıştır. Toplum ve hastane kökenli *E.coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında CTX-M üretim oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0.05$ ). Sonuç olarak çalışmamızda, GSBL üreten *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında CTX-M enzimlerinin yüksek oranda bulunduğu saptanmış;  $bla_{CTX-M}$  genlerinin kazanımının sıklıkla çoğul dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının ortaya çıkmasına yol açması nedeniyle, CTX-M üretiminin tanınmasının endemik hale gelen dirençli suşların izlenmesi açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, CTX-M enzimleri, *Enterobacteriaceae*.

## ABSTRACT

Widespread production of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae* strains which are resistant to extended-spectrum cephalosporins is the most remarkable example for rapid and global spread of plasmid mediated antimicrobial resistance in bacteria. Consecutive 200 ESBL producing *Enterobacteriaceae* strains out of 1640 isolates that were obtained from clinical samples (167 urine, 11 wound, 7 bronchoalveolar lavage, 3 peritoneal fluid, 2 cerebrospinal fluid, 2 biopsy, 2 tracheal aspirate, 2 conjunctiva, 1 abscess, 1 catheter) between February to July 2009 in our laboratory were included to this study. Among the 200 ESBL positive isolates 141 (70.5%) were *Escherichia coli*, 51 (26%) were *Klebsiella pneumoniae*, 5 (2.5%) were *Enterobacter* spp. and one of each (0.5%) *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis*. ESBL positivity was 11% among the 123 community-acquired strains and 13% among the 77 hospital acquired strains, the statistical difference being insignificant ( $p > 0.05$ ). The prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> beta-lactamase genes were detected by multiplex polymerase chain reaction with the use of two general primer sets: CTX-MA1 and CTX-MA2 primers for the amplification of CTX-M-1, CTX-M-2 and CTX-M-9 enzymes group, and CTX825-F and CTX825-R primers for the amplification of CTX-M-8 and CTX-M-25 enzymes group. *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 167 out of 200 strains (83.5%). CTX-M production rates in community and hospital acquired strains were found as 86.2% and 79.2%, respectively and no statistically significant difference was detected ( $p > 0.05$ ). CTX-M producing strains were either *E. coli* (n= 132) or *Klebsiella* spp. (n= 35) and were expressing one of the enzymes from CTX-M-1, CTX-M-2 or CTX-M-9 groups. No strains carrying CTX-M-8 or CTX-M-25 group enzymes were detected. CTX-M production rates in ESBL producing *E. coli* strains in community and hospital were found as 92.5% and 95.7%, respectively, whereas the same rates for ESBL producing *Klebsiella* spp. strains were 67.8% and 66.7%. The difference between the CTX-M production rates of community and hospital acquired strains was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). In conclusion, CTX-M prevalence was found high in ESBL producing strains of both *E. coli* and *Klebsiella* spp. Since *bla*<sub>CTX-M</sub> gene acquisition usually results in the emergence of multiple drug-resistant *Enterobacteriaceae* strains, screening for CTX-M type ESBL production in the laboratory has an important impact on monitoring the resistant strains which have endemic potential.

**Key words:** Extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M enzymes, *Enterobacteriaceae*.

## GİRİŞ

Geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi yaygın direnç mekanizmalarındandır<sup>1</sup>. *Enterobacteriaceae* suşlarında, TEM ve SHV tipi GSBL mutantlarından farklı, çeşitli tiplerde kazanılmış GSBL'ler tanımlanmıştır. Bunlar; CTX-M, VEB, GES/IBC, PER, TLA, BES ve SFO enzimleridir. Bu enzimler içinde, yayılımı TEM ve SHV türevleri ile karşılaştırılabilir nitelikte olan, hatta onları da geçen CTX-M enzimleridir<sup>1,2</sup>. Dünya genelinde CTX-M yayılımı; bakteriyel patojenler arasında plazmidle taşınan direnç elemanlarının hızlı ve küresel yayılımına en dikkat çekici örnektir<sup>2</sup>.

Konjugatif plazmid kökenli CTX-M tipi GSBL'lerin, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme özellikleri, aminoasit değişiminden bağımsız olarak intrensek niteliktedir<sup>3</sup>. CTX-M üreten suşlarda, sefotaksim minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri dirençli ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ), seftazidim MİK değeri sıklıkla duyarlı (2-8  $\mu\text{g/ml}$ ) olarak saptanırken, aztreonam MİK değeri ise değişkendir<sup>4</sup>. Bir diğer ayırıcı özellikleri ise, tazobaktamın CTX-M üzerine olan inhibitör etkisinin, klavulanik asitten 10 kat daha fazla olmasıdır<sup>3</sup>.

Günümüzde CTX-M tipi enzimlerin 60'tan fazla allelik varyantı bilinmektedir. Bu enzimler, aminoasit dizi benzerlikleri esas alınarak 6 grup içinde incelenmektedir. Her grup, ilk tanımlanan grup üyesinin adını almaktadır. (i) CTX-M-1 grubu; CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-28, CTX-M-30 ve FEC-1 enzimlerini, (ii) CTX-M-2 grubu; CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 ve Toho-1 enzimlerini, (iii) CTX-M-8 grubu; sadece CTX-M-8 enzimini, (iv) CTX-M-9 grubu; CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27 ve Toho-2 enzimlerini, (v) CTX-M-25 grubu; CTX-M-25, CTX-M-26 enzimlerini, (vi) CTX-M-45 grubu; sadece CTX-M-45 enzimini içermektedir<sup>2,5,6</sup>.

Bu çalışmada, öncelikle laboratuvarımızda izole edilen GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında CTX-M enzimlerinin sıklığının araştırılması amaçlanmış ve ayrıca beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmidlerle aktarılan diğer antibiyotik direnç genlerinin kazanımına bağlı değişen antibiyotik direnç oranlarının incelenmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Suşlar

Çalışmaya, Şubat-Temmuz 2009 tarihleri arasında Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1079'u toplum ve 561'i hastane kökenli olmak üzere toplam 1640 *Enterobacteriaceae* suşu dahil edildi. İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve BBL CRYSTAL™ Enteric/Nonfermenter ID sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanıldı.

### Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzolatların çeşitli antibiyotiklere karşı in vitro duyarlılıkları [ampisilin (10 µg), piperasilin (100 µg), sefalotin (30 µg), sefuroksim (30 µg), sefoksitin (30 µg), sefiksım (5 µg), seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), sefoperazon-sulbaktam (30/75 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), tobramisin (10 µg), netilmisin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), norfloksasin (10 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ; 25 µg) (Becton-Dickinson, ABD)], disk difüzyon yöntemiyle "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre araştırıldı ve değerlendirildi<sup>8</sup>. Antibiyogramın kalite kontrol değerlendirmesinde *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı.

### GSBL Üretiminin Fenotipik Olarak Taranması

GSBL üretiminin taranmasında çift disk sinerji testi kullanıldı. Bulanıklığı 0.5 McFarland olarak ayarlanmış bakteri inokulumu Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine ekildi. Petrinin merkezine amoksisilin-klavulanik asit diski ve bu diskin 20-25 mm uzağına sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefiksım, sefepim ve aztreonam diskleri (Becton-Dickinson, ABD) yerleştirildi. On altı-on sekiz saatlik inkübasyondan sonra, üçüncü kuşak sefalosporin, sefepim ve aztreonam disklerinin inhibisyon zonundaki genişleme ve üreme olan bölümlerde alansal inhibisyonların görülmesi GSBL üretimi olarak kabul edildi<sup>4,9</sup>. Testin değerlendirmesinde *E.coli* ATCC 25922 negatif kontrol, *Citrobacter amanolys*

*tica* (Université d'Auvergne Faculté de Médecine Service de Bactériologie, Fransa) ise pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

### CTX-M Genlerinin Araştırılması

Kalıp DNA, suşların bir gecelik (18-24 saat) MHA kültüründen hazırlandı. Seçilen iki koloni 100 µl distile su ile karıştırıldı ve hücreler 95°C'de 10 dakika bekletilerek parçalandı. 15.000g'de 2 dakika santrifüj yapılarak hücresel debri uzaklaştırıldı. Süpernatant, amplifikasyon için kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı<sup>10</sup>.

*bla*<sub>CTX-M</sub> beta-laktamaz genleri, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile, MyCycler™ termal döngü cihazı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak araştırıldı. CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 grubu CTX-M enzimlerini kodlayan genlerin PCR amplifikasyonu için 550 baz çifti (bç) büyüklüğünde PCR ürünü veren CTX-MA1 (5'-SCSATGTGCAGYAC-CAGTAA) ve CTX-MA2 (5'-CCGCRATATGRTTGGTGG-TG) primerleri kullanıldı (S= G veya C; Y= C veya T; R= A veya G). CTX-M-8 ve CTX-M-25 grubu CTX-M enzimlerini kodlayan genlerin PCR amplifikasyonu ise, 307 bç büyüklüğünde PCR ürünü veren CTX825-F (5'-CGCTTTGCCATGTGCAGCACC) ve CTX825-R (5'-GCTCA GTACGATCGAGCC) primerleri ile yapıldı. İnternal kontrol olarak 320 bç'lik ürün elde edilen, 16s rRNA gen bölgesine özgül primer çifti *rrs-1* (5'-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC) ve *rrs-2* (5'-TCGTTGCGGGACTTAACCCAC) kullanıldı<sup>10</sup>.

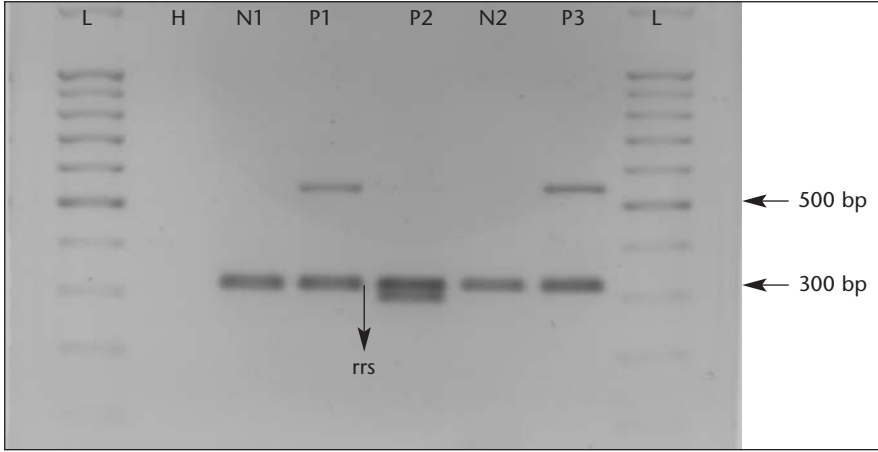
PCR karışımında Fermentas *Taq* polimeraz ve 2 mM dNTP (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, ABD) kullanıldı. 22 µl olan PCR karışımı; 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Fermentas), 0.1 µM CTX-MA1, CTX-MA2, CTX825-F, CTX825-R primerleri, 0.125 µM *rrs-1* ve *rrs-2* primerleri, 2.5 U Fermentas *Taq* içerecek şekilde hazırlandı<sup>10</sup>.

PCR karışımına 3 µl DNA eklendikten sonra, 10 dakika 37°C, 6 dakika 94°C'yi takiben; 1 dakika 92°C, 1 dakika 55°C, 1 dakika 72°C; 30 siklus ve 7 dakika 72°C son uzama basamağı olacak şekilde PCR uygulandı. PCR ürünleri, 0.5xTBE tampon (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) içinde %1.5'lik agaroz jellerde elektroforezi yapıncaya kadar 4°C'de saklandı<sup>10</sup>. Etidyum bromür ile hazırlanan jeller elektroforez sonrasında UV ışıkta incelendi. *bla*<sub>CTX-M</sub> genlerinin saptanması için yapılan PCR sonuçları Resim 1'de gösterildi.

PCR yönteminde kontrol olarak; İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *E.coli* [sınıf 2b (A); TEM-1 pozitif (negatif kontrol olarak)], *Klebsiella pneumoniae* [sınıf 2b (A); SHV-1 pozitif (negatif kontrol olarak)] ve *E.coli* [sınıf 2be (A); CTX-M-15 pozitif, grup 1] suşları ile Auvergne Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bakteriyoloji Servisi, Fransa'dan temin edilen *Citrobacter amonolytica* [sınıf 2be (A); CTX-M-8 pozitif, grup 8] suşu kullanıldı.

### İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 18.0 (Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde, ki-kare ve Fisher's exact testleri kullanıldı; p≤ 0.05 anlamlı kabul edildi.



**Resim 1.** *bla*<sub>CTX-M</sub> multipleks PCR ürünlerinin UV ışık altında agaroz jel fotoğrafı (L: 100 bç ağırlık belirteci; H: Distile su; N1: TEM-1 üreten *E.coli* negatif kontrol suşu; P1: CTX-M-1/2/9 grubu enzim üreten *E.coli* pozitif kontrol suşu; P2: CTX-M-8 üreten *C.amanolytica* pozitif kontrol suşu; N2: CTX-M negatif *E.coli* çalışma suşu; P3: CTX-M ürettiği saptanan *K.pneumoniae* çalışma suşu; *rrs*: 16s rRNA internal kontrol bandı).

## BULGULAR

Tarama testi ile toplam 1640 *Enterobacteriaceae* suşunun 200 (%12)'ünde GSBL varlığı saptanmıştır. Bunların 123'ü ayaktan başvuran, 77'si ise hastanede yatan hastalara ait klinik örneklerden (167 idrar, 11 yara, 7 bronkoalveoler lavaj, 3 periton sıvısı, 2 beyin omurilik sıvısı, 2 biyopsi, 2 trakeal aspirat, 2 konjunktiva, 1 apse, 1 kateter) izole edilen suşlardır. GSBL oranı toplum kökenli suşlarda %11 (n= 123), hastane kökenli suşlarda ise %13 (n= 77) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0.172). GSBL üreten 200 suşun 141 (%70.5)'i *E.coli*, 51 (%26)'i *K.pneumoniae*, 5 (%2.5)'i *Enterobacter* spp., 1 (%0.5)'i *Citrobacter freundii*, 1 (%0.5)'i *K.oxytoca*, 1 (%0.5)'i de *Proteus mirabilis* olarak tanımlanmıştır.

GSBL pozitif izolatların %83.5 (167/200)'inde PCR ile *bla*<sub>CTX-M</sub> genlerinin varlığı gösterilmiştir. Toplum kökenli suşların %86.2 (106/123)'sinde, hastane kökenli suşların ise %79.2 (61/77)'sinde CTX-M tipi GSBL saptanmış ve oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0.197). Bu suşların tümü CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 gruplarından enzim eksprese eden *E.coli* (n= 132) ve *Klebsiella* spp. (n= 35) olup, CTX-M-8 veya CTX-M-25 gruplarından enzim üreten suşa rastlanmamıştır.

Toplam 1640 suşun 1221'i *E.coli* (881'i toplum, 340'ı hastane kökenli) ve 263'ü *Klebsiella* spp. (130'u toplum, 133'ü hastane kökenli) olarak tanımlanmış; *E.coli* izolatlarının GSBL ve CTX-M üretim oranları sırasıyla %11.5 (141/1221) ve %10.8 (132/1221), *Klebsiella* spp. izolatlarının ise sırasıyla %19.7 (52/263) ve %13.3 (35/263) olarak bulunmuştur. Toplum ve hastane kökenli GSBL üreten *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında, CTX-M görülme oranları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla; p= 0.718, p= 0.857).

**Tablo I. Suşların Antibiyotiklere Direnç Oranları**

	CRO	CTX	CAZ	FEP	ATM	AMC	TZP	SCF	AK	NET	GN	NN	CİP	NOR	TMP-SMZ
Hastane kökenli	91	95	43	63	78	76	20	12	10	20	49	66	65	61	80
Toplum kökenli	97	96	38	60	73	75	13	8	7	17	51	67	64	63	72
Toplam	95	96	40	61	75	75	16	10	8	18	50	66	65	62	75

CRO: Seftriakson, CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, TZP: Piperasilin-tazobaktam, SCF: Sefoperazon-sulbaktam, AK: Amikasin, NET: Netilmisin, GN: Gentamisin, NN: Tobramisin, CİP: Siprofloksasin, NOR: Norfloksasin, TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol.

Toplum kökenli *E.coli* izolatlarının %10.6 (94/881)'sının GSBL ürettiği ve bunların da %92.5 (87/94)'inin *bla*<sub>CTX-M</sub> taşıdığı; hastane kökenli *E.coli* izolatlarının ise %13.8 (47/340)'inin GSBL ürettiği ve bunların da %95.7 (45/47)'sinin *bla*<sub>CTX-M</sub> taşıdığı saptanmıştır. Toplum ve hastane kökenli *E.coli* suşlarında, GSBL ve CTX-M oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla; p= 0.123; p= 0.136). Diğer taraftan toplum kökenli *Klebsiella* spp. izolatlarının %21.5 (28/130)'inin GSBL ürettiği ve bunların da %67.8'inin (19/28) *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri bulundurduğu belirlenirken; hastane kökenli *Klebsiella* spp. izolatlarının %18 (24/133)'inin GSBL ürettiği ve bunların da %66.7 (16/24)'sinin *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri bulundurduğu izlenmiştir. Toplum ve hastane kökenli *Klebsiella* spp. suşlarında da, GSBL ve CTX-M oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla; p= 0.151; p= 0.169).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde penisilin türevlerine ve birinci kuşak sefalosporine duyarlı olan suş saptanmamıştır. Beta-laktam-beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları içinde suşların en fazla sefoperazon-sulbaktam (%55) kombinasyonuna duyarlı olduğu belirlenmiştir. Beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörleri dışındaki antibiyotikler içinde en yüksek oranda direnç TMP-SMZ (%75)'ye aittir (Tablo I). Karbapeneme direnç gözlenmemiştir. CTX-M enzim grupları saptanan *E.coli* suşlarında gentamisin, siprofloksasin ve TMP-SMZ direnç oranları sırasıyla %51, %69 ve %72 olarak; *Klebsiella* spp. suşlarında ise sırasıyla %50, %79 ve %88 olarak saptanmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile orta düzey sefotaksim duyarlılığı gözlenen 9 suшта *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri saptanmamıştır. Bununla birlikte, seftazidim direnci gözlenen 80 suşun 57'sinde *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri bulunmuştur. Sefoksitin direnci gözlenen 17 suşun ise 14'ünde *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri saptanmıştır.

## TARTIŞMA

*Enterobacteriaceae* türleri arasında GSBL üretim oranı dünya genelinde çeşitlilik göstermektedir. Tigesiklin Değerlendirme ve Sürveyans Çalışması (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial; TEST) sonuçlarına göre, GSBL üretim oranları özellikle Latin Amerika bölgesinde izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında yüksek oranda bildirilmektedir<sup>11,12</sup>. Bu bölgeyi, Asya/Pasifik kıyası, Avrupa ve Kuzey Amerika takip etmektedir (sırasıyla saptanan

GSBL üretim oranları; %44, %22.4, %13.3 ve %7.5). Aynı bölgelerde izole edilen *E.coli* suşlarında bildirilen oranlar ise sırasıyla; %13.5, %12, %7.6 ve %2.2 olmak üzere daha düşük seyretmektedir. Aynı çalışmanın sadece Avrupa ülkelerini kapsayan sonuçlarına göre, *K.pneumoniae* suşlarında GSBL üretim oranı %15.5 olarak bildirilirken, *E.coli* suşlarında %9.8 oranında bildirilmiştir. Ayrıca, en yüksek oranda GSBL üretiminin gözlemlendiği ülke Yunanistan, en düşük ülke ise Danimarka olarak bildirilmiştir. Çalışmalarda incelenen suşların çoğunluğunu, hastane kökenli enfeksiyon etkeni olarak izole edilen suşlar oluşturmaktadır<sup>11,12</sup>. Ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz Bölgesinde yapılan çalışmalarda; genellikle daha düşük oranda GSBL ürettiği bildirilen *E.coli* suşları da dahil olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL üretiminin yaygınlaştığı bildirilmektedir<sup>13</sup>. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada, GSBL üretimi *K.pneumoniae* suşlarında %50-75, *E.coli* suşlarında %1-15 oranları arasında bildirilmektedir<sup>14</sup>. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak GSBL üretimi *Klebsiella* türlerinde (%19.7), *E.coli* (%11.5) suşlarına göre daha yüksek oranda saptanmıştır. *Klebsiella* türlerinde saptanan GSBL oranı, Avrupa'dan bildirilen oranlara yakın değerlerde gözlenirken, ülkemizden bildirilen oranlardan düşük bulunmuştur. Bu durumun, ülkemizden bildirilen oranların ağırlıklı olarak hastane kökenli suşlara ait olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. *E.coli* suşlarında gözlenen GSBL üretim oranları ise, hem Avrupa'dan hem de ülkemizden bildirilen oranlarla yakınlık göstermektedir.

Günümüzde, CTX-M enzim ailesi, çoğunlukla toplumda olmak üzere, hastane ortamında da en sık karşılaşılan GSBL tipidir<sup>12,15</sup>. Çoğu Avrupa ülkesi, Asya ve Güney Amerika'da CTX-M tipi GSBL'ler endemik olarak bulunurken, Kuzey Amerika'da Kanada haricinde Amerika Birleşik Devletleri'nden sporadik olgular bildirilmektedir<sup>16</sup>. İngiltere'den bildirilen sonuçlar, toplum (%37.9) ve hastane (%49.4) kökenli suşlarda en yaygın GSBL enziminin CTX-M olduğunu göstermiştir<sup>12</sup>. Pitout ve arkadaşları<sup>17</sup>, Kanada'da toplum kökenli *E.coli* suşlarında CTX-M oranını %64 olarak bildirmiştir. Avrupa'dan bildirilen çalışmalarda CTX-M üretim oranları, *E.coli* suşlarında %52-76 arasında, *Klebsiella* suşlarında ise %12-24 arasında değişmektedir<sup>2,6</sup>. Ülkemizde CTX-M tipi enzimlerin prevalansı ve dağılımı ile ilgili veriler sınırlıdır. Gönüllü ve arkadaşları<sup>18</sup>, GSBL üreten *E.coli* suşlarının %86.8'inde CTX-M-1 grubu enzimlerin üretildiğini ve CTX-M-15 insidansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yumuk ve arkadaşları<sup>19</sup>, toplum kökenli idrar yolu enfeksiyon etkeni GSBL üreten *E.coli* suşlarında CTX-M üretimini %76.5 oranında saptarken, CTX-M-15'in en yaygın enzim olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, toplum ve hastane kökenli GSBL üreten suşlarda CTX-M tipi enzim varlığı sırasıyla %86.2 ve %79.2 oranlarında gözlenmiş ve Avrupa'dan bildirilen oranlardan yüksek olduğu izlenmiştir. Toplum ve hastane kökenli GSBL üreten *E.coli* suşlarında CTX-M görülme oranı (sırasıyla; %92.5 ve %95.7), toplum ve hastane kökenli *Klebsiella* spp. suşlarından (sırasıyla; %67.8 ve %66.7) yüksek saptanmıştır. Bu veriler, CTX-M üreten suşların gerek hastane ortamında gerekse toplumda yaygın olarak bulunduğunu düşündürmektedir.

Fransa, İspanya, Kanada, İngiltere ve Kore gibi birçok ülkede yapılan çalışmalarda, CTX-M üreten *E.coli* suşlarında, TMP-SMZ, siprofloksasin, gentamisin ve tetrasiklin koresistansının bulunduğu bildirilmektedir<sup>12</sup>. Çalışmamızda ise, GSBL üreten suşların en yüksek oranda TMP-SMZ (%75)'ye dirençli olduğu gözlenirken, CTX-M tipi GSBL üreten

*E.coli* suşlarında TMP-SMZ direnci %72, *K.pneumoniae* suşlarında ise %88 olarak saptanmıştır. Günümüzde, CTX-M tipi GSBL üreten epidemik *Enterobacteriaceae* suşları ile florokinolona direnç gelişimi arasında genetik ilişki bulunduğu bildirilmektedir<sup>12</sup>. Bu direnç, suşun çeşitli *qnrA* ve *qnrB* genlerini kazanımı ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda *qnrA* geni, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> ve diğer *bla*<sub>CTX-M</sub> dışı genlerle ilişkilendirilirken, *qnrB* geni, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ve *bla*<sub>SHV-12</sub> genleri ile ilişkilendirilmiştir<sup>15</sup>. Çalışmamızda incelenen suşların tamamının CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 gruplarına ait enzim çeşitlerini bulundurduğu saptanmıştır. CTX-M-15 ise grup 1'de bulunmaktadır ve ülkemizde prevalansı yüksek olarak bildirildiğinden, siprofloksasine karşı gözlenen direncin gelişiminde *qnr* genlerinin kazanımının da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, florokinolon direncine benzer şekilde, GSBL üreten suşlarda özellikle gentamisin olmak üzere aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç oranları da yüksektir<sup>3</sup>. Çalışmamızda, gentamisin direnci, TMP-SMZ ve siprofloksasin dirençlerinden daha düşük oranda gözlenmiştir. Günümüzde, aminoglikozid modifiye edici enzim arma, CTX-M-3 enzimi ile ilişkilendirilmektedir<sup>20</sup>. Gentamisin direncinin daha düşük oranda gözlenmesi Türkiye'de CTX-M-15 enzimin yaygın olarak bulunuyor olması ile açıklanabilir<sup>18,19</sup>.

CTX-M ailesine ait enzimlerin hastane kökenli suşlara ilaveten toplum kökenli suşlarda da hızlı yayılımı CTX-M pandemisi ile sonuçlanmıştır<sup>15</sup>. Dolayısıyla, klinik örneklerden izole edilen, öncelikli olarak *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşları olmak üzere, GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinde, enzimin CTX-M tipi olup olmadığının tanımlanması, direnç kazanımının takibi açısından önem arz etmektedir. CTX-M tipi GSBL'ler, TEM- ve SHV-türevi GSBL'lerin aksine seftazidimden ziyade sefotaksimi daha çok hidrolize edebilen enzimlerdir<sup>15</sup>. Bununla birlikte Eckert ve arkadaşları<sup>21</sup>, yüksek düzeyde seftazidim direnci gözledikleri 10 suşun CTX-M-15 enzimi ürettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, mutant CTX-M-3, CTX-M-9 ve CTX-M-15, CTX-M-16 ve CTX-M-19 enzimlerini üreten suşlarda da yüksek düzey seftazidim direnci bildirilmektedir<sup>22</sup>. Güncel çalışmalar, CTX-M tipi GSBL'lerin prevalansının takibi amacıyla yapılan surveyanslarda, seftazidim direncinin belirteç olarak kullanılmaması gerekliliği üzerinde durmaktadır<sup>23</sup>. Sefalosporini parçalayan, klavulanik asitle inhibe olmayan enzim tipi üreten *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında plazmidle kazanılan AmpC beta-laktamaz varlığı bildirilmektedir<sup>24,25</sup>. Aynı plazmid üzerinde AmpC beta-laktamaz genine ek olarak sıklıkla diğer direnç genleri ile GSBL genleri de bulunabilmektedir<sup>26,27</sup>. Fenotipik değerlendirmede, CTX-M tipi GSBL ile benzerlik gösteren AmpC beta-laktamaz ilave olarak sefamisinleri de parçalamaktadır<sup>28,29</sup>. Yukarıda aktarılan direnç özelliklerini gösteren bakterilerde, tarama ve doğrulama testleriyle CTX-M tipi GSBL tanımlaması güçleşmektedir. Çalışmamızda, çok sayıda CTX-M enziminin tek bir multipleks PCR ile saptanması ve suşların CTX-M enzim üretimi açısından taranması, değerlendirilmesi güç suşların saptanmasını olanaklı kılmıştır. Böylece, seftazidime dirençli 80 suşun 57'sinde *bla*<sub>CTX-M</sub> geni saptanırken, sefoksitin direnci gözlenen 17 suşun 14'ünde *bla*<sub>CTX-M</sub> geni saptanmıştır.

Sonuç olarak; GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının hastane kökenli enfeksiyonlardan sıkça izole edilmelerinin yanı sıra, toplum kökenli enfeksiyonlarda da sık karşılaşılabilecek bakteriler oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, GSBL üreten suşlarda CTX-M enzimleri-



nin yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. CTX-M enziminin yayılımının, plazmid üzerinde *bla*<sub>CTX-M</sub> genleri ile birlikte bulunma ihtimali olan antibiyotik direnç genlerinin kazanımına bağlı olarak, birden çok antibiyotik sınıfına dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, CTX-M tipi GSBL üretiminin taranması, enzimin yayılma şekli hakkında bilgi birikimi oluşturarak, çoğul dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının takibine olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 667-86.
2. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 33-41.
3. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect 2003; 47: 273-95.
4. Paterson DL. Extended-spectrum beta-lactamases: the European experience. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 697-701.
5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1-14.
6. Galas M, Decusser JW, Breton N, et al. Nationwide study of the prevalence, characteristics and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in France. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 786-9.
7. 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 urine sample of a hospitalized patient. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 421-9.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth Informational Supplement, M100-S18. 2008. CLSI, Wayne, PA.
9. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
10. Pitout JD, Hamilton N, Church DL, Nordmann P, Poirel L. Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 291-7.
11. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. J Hosp Infect 2009; 73: 345-54.
12. Denton M. *Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agent 2007; 29: 9-22.
13. Borg MA. Antimicrobial resistance in the Mediterranean region, pp: 135-48. In: Gould IM, Meer JWM (eds), Antibiotic Policies: Fighting Resistance. 2008, 9<sup>th</sup> ed. Springer US, New York.
14. Esen Ş. GSBL ve İBL yapan enterik bakteriler: klinik önemi, tedavi. ANKEM 2008; 22: 28-35.
15. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 466-75.
16. Mesco Meglic KM, Koren S, Palepou MF, et al. Nationwide survey of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 287-91.
17. Pitout JD, Le P, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. Antimicrobial susceptibility of well-characterised multi-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/tazobactam. Int J Antimicrob Agent 2008; 32: 333-8.
18. Gönüllü N, Aktaş Z, Bal Kayacan Ç, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. J Clin Microbiol 2008; 46: 1110-2.

19. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 284-8.
20. Bradford PA, Dean CR. Resistance of gram-negative bacilli to antimicrobials, pp: 97-160. In: Fong IW, Drlica K (eds), *Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century*. 2008, 9<sup>th</sup> ed. Springer US, New York.
21. Eckert C, Gautier V, Salladin-Allard M, et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1249-55.
22. Cheng J, Gao W, Yin J, et al. Phenotypic and molecular characterization of two novel CTX-M enzymes carried by *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Biol Reports* 2009; 36: 423-622.
23. Hawkey PM, Munday CJ. Multiple resistance in gram-negative bacteria. *Rev Med Microbiol* 2004; 15: 51-61.
24. Wang Q, Cheng J, Chen Y, Ye Y, Li JB, Zhang XJ. Characterization of a novel AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* strain isolated in China. *Curr Microbiol* 2008; 57: 558-63.
25. Fenollar-Ferrer C, Frau J, Donoso J, Munoz F. Evolution of class C beta-lactamases: factors influencing their hydrolysis and recognition mechanisms. *Theor Chem Account* 2008; 121: 209-18.
26. Choi SH, Lee JE, Park SJ, et al. Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* and *Morganella morganii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 557-61.
27. Shahid M, Ensor VM, Hawkey PM. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* with plasmid-mediated CMY-6 and CTX-M-15 beta-lactamases in community in North India. *World J Microbial Biotechnol* 2009; 25: 1439-46.