

TOPLUM KAYNAKLI ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONU ETKENİ *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA GSBL ENZİM TİPLERİNİN İZOELEKTRİK ODAKLAMA VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF ESBL TYPES IN COMMUNITY ACQUIRED URINARY *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES BY ISOELECTRIC FOCUSING AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Duygu DAĞLAR¹, Gözde ÖNGÜT¹, Dilara ÖĞÜNÇ¹, Betil ÖZHAK BAYSAN¹,
Hadiye DEMİRBAKAN¹, Nevgün SEPİN ÖZEN¹, Meral GÜLTEKİN¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya. (gongut@akdeniz.edu.tr)

ÖZET

Bu çalışmada, toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve fenotipik tarama-doğrulama testleri (E-test ve kombine disk yöntemleri) ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif olduğu saptanan 56 *Escherichia coli* suşunda, izoelektrik odaklama (IEO) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle GSBL enzim tiplerinin araştırılması amaçlanmıştır. IEO yöntemiyle en sık (n= 44, %79) olarak pI değeri 8.2 olan bant (CTX-M ile uyumlu) elde edilmiştir. İzolatların 24 (%43)'ünde CTX-M ve TEM ile uyumlu bantlar, 16 (%29)'sında sadece CTX-M ile uyumlu bant, 3 (%5)'ünde CTX-M, TEM ve SHV uyumlu bantlar, birinde CTX-M ve SHV ile uyumlu bantlar ve birinde sadece TEM ile uyumlu bant saptanmıştır. On bir (%20) suшта ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. PCR yöntemiyle suşların 52 (%93)'sinde CTX-M; 36 (%64)'sında TEM; 6 (%11)'sında ise SHV pozitifliği saptanırken; 29 (%52) suшта CTX-M ve TEM, 3 suшта CTX-M ve SHV ve 3 suшта da CTX-M, TEM ve SHV genlerinin birlikte bulunduğu izlenmiştir. Suşların hiçbirinde PER-1 enzimi saptanmamıştır. IEO yönteminde bant gözlenmeyen 11 suşın 5'inde PCR ile CTX-M ve TEM enzimleri, 3'ünde CTX-M ve 3'ünde TEM enzimi varlığı gösterilmiştir. CTX-M, TEM ve SHV enzim varlığını saptamada IEO ve PCR yöntemlerinin uyumu sırasıyla %85, %78 ve %67 olarak bulunmuştur. GSBL enzimlerini kodlayan plazmidler, beta-laktam antibiyotikler dışında aynı zamanda pek çok antibiyotiğe ait direnç genlerini de taşımaktadır. Bu nedenle, sadece hastane kaynaklı değil, toplum kaynaklı enfeksiyon etkenlerinde de GSBL varlığının araştırılması ve enzim tiplerinin saptanması, tedavide uygun antimikrobiyal seçimine yön vermesi açısından önemlidir.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, CTX-M, TEM, SHV.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) types by isoelectric focusing (IEF) and polymerase chain reaction (PCR) methods in 56 *Escherichia coli* strains isolated from urine samples of patients with community-acquired urinary tract infection and determined as ESBL positive with the phenotypic screening tests (E test and combined disk method). IEF revealed that most of the strains produced 1 to 3 different bands, mostly at the isoelectric points 8.2 (n= 44, 79%) compatible with CTX-M. Twenty four (43%) isolates had CTX-M and TEM enzyme bands together, 16 (29%) isolates had only CTX-M enzyme bands, 3 (5%) isolates had CTX-M, TEM, SHV bands, one had CTX-M and SHV enzyme bands together, and one had only TEM band. Eleven *E.coli* strains did not yield any enzyme bands. PCR analysis revealed that 93% (n= 52) of the isolates had CTX-M, 64% (n= 36) had TEM and 11% (n= 6) had SHV, while 29 (52%) had CTX-M + TEM, three had CTX-M + SHV, and three had CTX-M + TEM + SHV genes together. PER-1 type beta-lactamases were not detected by PCR method. PCR analysis of the eleven strains that yielded no band in IEF showed that 5 strains had CTX-M + TEM, 3 had CTX-M and 3 had TEM enzyme genes. The consistency between IEF and PCR methods for the determination of CTX-M, TEM and SHV enzymes was 85%, 78% and 67%, respectively. Genes encoding ESBL's are usually located on transferrable plasmids that may also carry other resistance determinants. Thus detection of beta-lactamase enzyme types in ESBL positive bacteria is important for the choice of appropriate antimicrobial agents for treatment.

Key words: *Escherichia coli*, extended-spectrum beta-lactamases, CTX-M, TEM, SHV.

GİRİŞ

Enterik gram-negatif bakterilerin antibiyotiklerle savaşlarında en önemli silahlarından biri beta-laktamaz sentezleridir. Bu sürecin başlangıcında plazmid kaynaklı beta-laktamazlar, sadece penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz eden enzimler özelliğinde iken, günümüzde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ile üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı da hidroliz edebilme yetisine ulaşmışlardır. İlk kez 1983 yılında GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşunun saptanmasından bugüne, *Enterobacteriaceae* ailesi içinde GSBL üretimine bağlı antibiyotiklere dirençli suşların sıklığında belirgin artış gözlenmektedir¹. GSBL üretimi, önceleri hastanede yatan hastalarda enfeksiyon etkeni olan *K.pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında sık saptanırken, günümüzde toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *E.coli* suşlarında da görülme sıklığı artmıştır. Toplum kaynaklı enfeksiyonların %5-15'inin bakteriyemiye yol açtığı ve bu oranın gün geçtikçe arttığı bilinmektedir. Bu nedenle GSBL üreten *E.coli* enfeksiyon sıklığının yüksek olduğu hastanelerde toplum kaynaklı sepsis için tedavi protokollerinin gözden geçirilmesi gerektiği bildirilmektedir².

GSBL enzimleri, esas olarak TEM ve SHV enzimlerinden köken alsalar da, kökenleri farklı olan CTX-M, OXA-1, PER-1 gibi çok sayıda farklı enzim de tanımlanmıştır. Günümüzde GSBL enzim çeşidi 200'ü aşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde TEM ve SHV kökenli enzimler hala baskınken, Avrupa'da TEM veya SHV kökenli enzimlerden daha sonra ortaya çıkmasına karşın en sık saptanan CTX-M türü enzimlerdir².

Beta-laktamaz enzim tiplerinin laboratuvar tanısında kullanılan izoelektrik odaklama (IEO) yöntemiyle, enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları saptanarak hangi enzim grubuna dahil oldukları belirlenmektedir. GSBL sorununun ilk belirdiği yıllarda, IEO yön-

temiyle bakterinin sentezlediği kromozomal ya da plazmid kontrolündeki birkaç enzim kolaylıkla ayırt edilebilmiştir³. Ancak, çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip enzim türlerinin artması sonucunda, İEO tek başına enzimleri belirlemede yetersiz kalmaktadır. Gelinen noktada, özgül GSBL tipinin belirlenmesi için moleküler yöntemlere gereksinim vardır. En yaygın kullanılan moleküler yöntem, beta-laktamaz genlerine özgül oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur⁴.

Çalışmamızda toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan GSBL pozitif *E.coli* suşlarında İEO ve PCR yöntemleriyle beta-laktamaz varlığı ve tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Biriminde; Nisan 2004-Mart 2005 tarihleri arasında toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen; "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen⁵ fenotipik tarama ve doğrulama testleriyle (E-test ve kombine disk yöntemleri) GSBL ürettiği saptanan 56 *E.coli* suşu çalışmaya alındı. Söz konusu zaman sürecinde idrar kültürlerinden izole edilen *E.coli* suşlarında GSBL oranı %18 (217/1198) olarak belirlendi.

GSBL enzimlerinin izoelektrik noktalarını belirlemek amacıyla yarı otomatize bir elektroforez sistemi olan "Model 111 Mini IEF Cell" cihazı (Biorad, Hercules, Kaliforniya, ABD) kullanıldı. Beta-laktamaz eldesi için suşlara sonikasyon uygulandı. Elde edilen sonikatlar, +4°C'de 13.000 rpm'de 10 dakika çevrildi ve beta-laktamaz içeren üst sıvılar -20°C'de saklandı. Sonik ekstrede beta-laktamaz varlığı nitrosefin yöntemiyle saptandı. Enzimlerin izoelektrik noktaları (pI), protein belirteci İEO Standart 4.45-9.6 ve referans enzimler (TEM-1: 5.4, SHV-1: 7.6) ile karşılaştırıldı. pI değeri 8.0-8.4 olan enzimler CTX-M; 5.0-5.4 olanlar TEM; 7.4-7.6 olanlar SHV ile uyumlu olarak değerlendirildi^{3,6}.

Araştırmamızda, TEM, SHV, CTX-M ve PER-1 beta-laktamaz genlerinin varlığı PCR yöntemiyle Tablo I'deki öncüller kullanılarak araştırıldı^{4,7}. Isı döngüleri "Perkin Elmer GenAmp 9600" (Roche, ABD) cihazında gerçekleştirildi. PCR ürünleri elektroforez jelinde yürütülerek ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda değerlendirildi.

Tablo I. PCR Yönteminde Kullanılan Öncül Setleri

Öncül	Polarite	Dizi
TEM	TEM-F	5'-atgagtattcaacatttccg-3'
	TEM-R	5'-ttactgtcatgccatcc-3'
SHV	SHV-F	5'-cgccgggttattcttattgtcgc-3'
	SHV-R	5'-tctttccgatgccgccagtc-3'
CTX-M	CTX-F	5'-cgctttgcgatgtgcag-3'
	CTX-R	5'-acggcgatcgttggt-3'
PER-1	PER-1F	5'-atgaatgtcattataaagc-3'
	PER-1R	5'-aatttgggcttagggcgagaa-3'

Çalışmada pozitif kontrol olarak, CTX-M, TEM, SHV ve PER-1 varlığı bilinen dört örnek kullanıldı.

BULGULAR

GSBL pozitif *E.coli* suşlarında İEO yöntemiyle elde edilen izoelektrik nokta değerleri ve PCR ile araştırılan CTX-M, TEM, SHV, PER enzim sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir.

İzolatların İEO yöntemiyle pI değerleri irdelendiğinde; en sık olarak (n= 44, %79) pI değeri 8.2 olan (CTX-M ile uyumlu) bandın saptandığı görülmüştür. İzolatların yarısında (n= 28) TEM enzimiyle uyumlu izoelektrik nokta değeri (pI= 5.4) elde edilmiştir. SHV enzimi ile uyumlu pI değeri 7.6 olan bant sadece 4 (%7) suшта saptanmıştır.

İzolatların 16 (%29)'sında sadece CTX-M ile uyumlu, birinde ise sadece TEM ile uyumlu bant gözlenirken; 24 (%43) suşun CTX-M ve TEM ile uyumlu; 3 (%5) suşun CTX-M, TEM ve SHV ile uyumlu ve bir suşun CTX-M ve SHV ile uyumlu bantları bir arada eksprese ettikleri saptanmıştır. Suşların 11 (%20)'inde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

PCR sonuçları irdelendiğinde; suşların 52 (%93)'sinde CTX-M; 36 (%64)'sında TEM; 6 (%11)'sında SHV enzimi pozitif olarak saptanmıştır. Örneklerin 17 (%30)'sinde tek başına CTX-M, 29 (%52)'unda CTX-M ve TEM; 4'ünde tek başına TEM, 3'ünde CTX-M ve SHV; 3'ünde CTX-M, TEM ve SHV genleri bir arada saptanmıştır. Suşların hiçbirinde PER-1 enzimi tespit edilmemiştir.

PCR yöntemiyle CTX-M enzimi saptanan 52 *E.coli* suşunun 44'ünde; TEM enzimi saptanan 36 suşun 28'inde; SHV enzimi saptanan 6 izolatın 4'ünde İEO yöntemiyle söz konusu enzimlerle uyumlu bantlar elde edilmiştir. İEO yönteminde bant gözlenmeyen 11 suşun 5'inde PCR yöntemiyle CTX-M ve TEM enzimleri, 3'ünde CTX-M enzimi, 3'ünde TEM enzimi varlığı gösterilmiştir.

CTX-M, TEM ve SHV enzim varlığını saptamada İEO ve PCR yöntemlerinin uyumu sırasıyla %85, %78 ve %67 olarak bulunmuştur (Tablo II).

TARTIŞMA

CTX-M türü enzimler TEM ve SHV dışı GSBL'ler arasında en sık saptanan enzim türüdür. TEM ve SHV türevi GSBL'lerden farklı olarak CTX-M türü enzimler, sefotaksim ve seftriaksonu seftazidimden daha iyi hidroliz eder ve klavulanik aside göre tazobaktamla daha iyi inhibe olur⁸⁻¹⁰.

TEM ve SHV tipi enzimler 1990'lı yıllarda en sık gözlenen GSBL enzimleri olup, özellikle *K.pneumoniae*'da sık olarak saptanmıştır¹¹. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise CTX-M enzimlerinin baskın hale geldiği ve özellikle *E.coli* türlerinde bu enzimlerin sık görüldüğü bildirilmiştir¹¹⁻¹³. Pallecchi ve arkadaşları¹⁴ 2005 yılında 50 *E.coli* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların 44'ünde PCR yöntemiyle CTX-M enzim pozitifliği saptamışlardır. Brigante ve arkadaşları¹⁵ İtalya'da 5 yıl süresince topladıkları izolatlar ile yaptıkları çalışmalarında, 200 GSBL pozitif izolatın 53'ünde CTX-M enzimi saptamışlar ve bu sıklığı ok-

Tablo II. PCR ve IEO Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlar

Suş	Stok no	PCR				Suş	Stok no	IEO	PCR				IEO
		CTX-M	TEM	SHV	PER				CTX-M	TEM	SHV	PER	
7141		+	-	-	-	8.2	7142		+	+	-	-	8.2, 5.4
7379		+	-	-	-	8.2	5548		+	+	-	-	8.2, 5.4
5638		+	-	-	-	8.2	5988		+	-	+	-	8.2, 5.4
7502		+	-	-	-	8.2	7216		+	+	-	-	8.2, 5.4
6048		+	-	-	-	8.2	5699		+	+	-	-	8.2, 5.4
5450		+	-	-	-	8.2	6226		+	+	-	-	8.2, 5.4
5382		+	-	-	-	8.2	7242		+	+	-	-	8.2, 5.4
6447		+	-	-	-	8.2	5299		+	+	-	-	8.2, 5.4
7367		+	-	-	-	8.2	7077		+	+	-	-	8.2, 5.4
5689		+	-	-	-	8.2	6840		+	+	-	-	8.2, 5.4
5813		+	-	-	-	8.2	7344		+	+	-	-	8.2, 5.4
5398		+	-	-	-	8.2	7256		+	+	+	-	8.2, 5.4
6224		+	-	-	-	8.2	6700		+	+	-	-	8.2, 5.4
5158		+	-	-	-	8.2	7256		+	+	-	-	8.2, 5.4, 7.6
7089		+	-	+	-	8.2	7533		+	+	+	-	8.2, 5.4, 7.6
6497		+	-	+	-	8.2	7531		+	+	+	-	8.2, 5.4, 7.6
5481		-	+	-	-	5.4	5701		+	-	+	-	8.2, 7.6
5447		+	+	-	-	8.2, 5.4	5946		-	+	-	-	-
5713		+	+	-	-	8.2, 5.4	7411		-	+	-	-	-
5478		+	+	-	-	8.2, 5.4	5440		+	+	-	-	-
7032		+	+	-	-	8.2, 5.4	7103		+	-	-	-	-
5715		+	+	-	-	8.2, 5.4	6981		+	+	-	-	-
6697		+	+	-	-	8.2, 5.4	7535		+	+	-	-	-
5471		+	+	-	-	8.2, 5.4	5987		+	-	-	-	-
6628		+	+	-	-	8.2, 5.4	5999		+	+	-	-	-
7292		+	+	-	-	8.2, 5.4	7529		+	-	-	-	-
6047		+	+	-	-	8.2, 5.4	5888		+	+	-	-	-
5441		+	+	-	-	8.2, 5.4	6697		-	+	-	-	-

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, IEO: Izoelektrik odaklama.

siiminozefalosporin kullanımının yaygınlığına bağlamışlardır. Mugnaioli ve arkadaşları¹⁶, PCR yöntemiyle GSBL pozitif saptanan *Enterobacteriaceae* suşlarındaki CTX-M enzim pozitifliğini %19.7, *E.coli* suşlarında ise %54.8 olarak bildirmişlerdir. Bano ve arkadaşları¹⁷ PCR yöntemiyle toplum kaynaklı *E.coli* suşlarında yaptıkları çalışmada, CTX-M-9, SHV ve TEM oranlarını sırasıyla %64, %18 ve %18 olarak bulmuşlardır. Londra'da sefotaksim ve seftazidim direnci 2001 yılında %2'nin altındayken, büyük çoğunluğu CTX-M tipi enzimlere bağlı olarak 2004 yılının ilk çeyreğinde %7.5'e yükselmiştir¹⁸. CTX-M tipi enzimlere bağlı olarak GSBL'lerin epidemiyolojisindeki progresif değişim, Kuzey İtalya ve Avusturya'da yapılan iki izleme araştırmasında belirlenmiştir. Çalışma bölgelerinde süreyans başlangıcında GSBL üreten *E.coli* suşları arasında CTX-M enzim prevalansı çok düşük veya sıfır iken (1999 yılında İtalya'da %12.5, 1998 yılında Avusturya'da %0), takip eden yıllarda artarak 2003 yılında İtalya'da %38.2, 2004 yılında Avusturya'da %85'e yükselmiştir¹⁹.

Ülkemizde 2004-2005 yılları arasında Gür ve arkadaşları²⁰ tarafından yapılan bir süreyans çalışmasında, GSBL üreten kan izolatlarının %71.4'ünde CTX-M türleri gösterilmiştir. Gülay ve arkadaşlarının²¹ 2002-2003 yıllarında yedi farklı merkezden topladıkları GSBL üreten izolatlar ile yaptıkları çalışmada, CTX-M sıklığı *E.coli* izolatlarında %76, *K.pneumoniae*'de %83, *Enterobacter* spp. izolatlarında ise %50 olarak bulunmuştur. Aktaş ve arkadaşları²², *E.coli* izolatlarının tamamında, *K.pneumoniae* izolatlarının ise %47'sinde CTX-M enzim varlığı bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, izolatların 29 (%52)'unda CTX-M ve TEM; 3 (%5)'ünde CTX-M, TEM ve SHV; 1'inde ise CTX-M ve SHV genleri bir arada saptanmıştır. Araştırmamızda saptadığımız yüksek (%93) CTX-M oranı, tüm dünyada ve ülkemizde artan CTX-M sıklığı ile uyumludur. İzolatların 36 (%64)'sında TEM, 6 (%11)'sında SHV enzimi varlığı gösterilmiştir. PER-1 enzimi saptamamız da, güncel epidemiyolojik verilerle uyumludur. Tablo II'de görüldüğü gibi, toplum kaynaklı üriner enfeksiyon etkeni *E.coli* suşlarının %41'inde tek enzim aktivitesi varken, %59'unda 1'den fazla enzim aktivitesi saptanmıştır.

Araştırmamızda, GSBL pozitif *E.coli* suşlarının tümünde İEO ve PCR yöntemleri uygulanmış ve pratik uygulamada GSBL enzimlerinin araştırılmasında bu yöntemlerin kullanımının tartışılması da amaçlanmıştır. PCR ile CTX-M enzimi saptadığımız 52 izolatın 44 (%85)'ünde İEO ile CTX-M ile uyumlu bantlar elde edilmiştir. TEM enzimi açısından değerlendirdiğimizde bu oran %78 (28/36)'dır. SHV enzimi saptanan alt izolatın 4'ünde İEO yöntemiyle SHV ile uyumlu bant gözlenirken, diğer iki izolatta CTX-M ile uyumlu bant saptanmış ve bu suşlarda da aynı zamanda PCR ile CTX-M varlığı gösterilmiştir. pl değeri CTX-M ile uyumlu olan izolatların (n= 44) tümünde PCR ile CTX-M varlığı gösterilmiştir. Benzer şekilde İEO yöntemi ile TEM ve SHV ile uyumlu bantlar elde edilen suşların (sırasıyla; n= 28 ve n= 4) tümünde söz konusu enzimler PCR yöntemiyle saptanmıştır. Çalışmamızda İEO yöntemiyle bant saptanmayan 11 (%20) izolatta PCR ile enzim varlığının gösterilmesi dikkat çekici bir bulgudur. Bunun nedeni, enzimin zayıf ekspresyonu sonucunda İEO yönteminde bant saptanmaması olarak yorumlanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, CTX-M enzim sıklığının %93 gibi yüksek oranda çıkması GSBL enzim tiplerinin belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Bu sayede GSBL üreten suşların yayılımını önlemek için gerekli kontrol önlemlerinin alınması ve uygun antibiyotik kullanım politikalarının geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Günümüzde GSBL üreten suşların hastanede sınırlı kalmayıp toplumda da sorun oluşturmaya başlaması, antimikrobiyal tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Rutin uygulamada, sayıları hergün artan GSBL enzimlerinin araştırılmasında, önce İEO yöntemiyle beta-laktamaz enzimlerinin izoelektrik odak noktalarına göre gruplandırılmasını yapmak, PCR yönteminde kullanılacak primerlerin hangileri olacağına karar vermede yol gösterici olacaktır. Dikkat edilmesi gereken nokta, İEO ile bant saptanmayan suşlarda da enzim aktivitesi olabileceği ve bunun araştırılması gerekliliğidir.

TEŞEKKÜR

İEO yöntemiyle ilgili eğitim aldığımız Prof. Dr. Zeynep Gülay (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Demirbakan H, Midilli K, Ogunc D, et al. Investigation of plasmid mediated AmpC beta-lactamase types in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* isolates resistant or intermediate to cefoxitin. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 545-51.
- Cornaglia G, Garau J, Livermore DM. Living with ESBLs. Clin Microbiol Infect 2008; 14(Suppl 1): 1-2.
- Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88: 169-78.
- Nuesch-Inderbilen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with Etest. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 398-402.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved Standard M2-A9. 2006, 6th ed. CLSI, Wayne, Pa.
- Pai H, Kang CI, Byeon JH, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents Chemother 2004; 48:3720-8.
- Erac B, Gulay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. Folia Microbiol (Praha) 2007; 52: 535-41.
- Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2269-75.
- Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, et al. Characterization of the extended- spectrum β -lactamase reference strain *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2382-8.
- Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). Clin Microbiol Infect 2005; 11(Suppl 4): 1-16.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 657-86.
- Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, Ramon Herandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 625-31.
- Livermore D. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 165-74.

14. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended- spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2720-5.
15. Brigante G, Luzzaro F. Evolution of CTX-M type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *J Antimicrob Agents* 2005; 25: 157-62.
16. Mugnaioli C, Luzzaro F. CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2700-6.
17. Bano RJ, Navarro MD. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1089-94.
18. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 56: 451-4.
19. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1):1-2.
20. Gur D, Gulay Z, Arıkan Akan O, 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.
21. Gulay Z, Terek G, Erac B. High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of *Enterobacteriaceae* in Turkey. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). May 1-4, 2004, Prague. Poster No.752.
22. Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'da genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların isoelectric focusing ve PCR ile araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. 8-10 Nisan 2004, İstanbul. Poster No.19.