

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Nozokomiyal *Escherichia coli* İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Oranları ve Klonal İlişkinin Araştırılması*

Investigation of Beta-Lactamase Genes and Clonal Relationship Among the Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Nosocomial *Escherichia coli* Isolates

Sündüz GÖRGEÇ¹, Çiğdem KUZUCU², Barış OTLU², Funda YETKİN³, Yasemin ERSOY³

¹ Malatya Halk Sağlığı Laboratuvarı, Malatya.

¹ Malatya Public Health Laboratory, Malatya, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² Inonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

³ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

³ Inonu University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Malatya, Turkey.

* Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)
Birimi tarafından 2010/51 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 20.01.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 16.10.2014

ÖZ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten mikroorganizmalar günümüzde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Özellikle CTX-M beta-laktamazı üreten *Escherichia coli*, tüm dünyada yayılarak hem nozokomiyal hem de toplumsal kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, GSBL üreten hastane kökenli *E.coli* izolatlarında beta-laktamaz gen prevalansı, antibiyotik duyarlılıkları ve klonal ilişkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmaya, Haziran 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında hastanede yatan hastaların idrar (n= 26), kan (n= 25) ve yara (n= 25) örneklerinden izole edilen ve CDC kriterlerine göre hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan toplam 76 GSBL pozitif *E.coli* suşu dahil edilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları, CLSI önerilerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. GSBL varlığı çift disk sinerji testi ile saptanmış, şüpheli olgularda sefotaksim/sefotaksim klavulanik asit E-test şeriti (AB Biodisk, İsveç) kullanılmıştır. TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, OXA-2 grup ve OXA-10 grup beta-laktamaz genlerinin varlığı bu bölgelere özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin tespiti için PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) yöntemi kullanılmıştır. GSBL üreten *E.coli* suşlarının en sık yoğun bakım (%35), dahiliye (%16) ve

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Sündüz Görgeç, Malatya Halk Sağlığı Laboratuvarı, Malatya, Türkiye.
Tel (Phone): +90 506 542 7086, E-posta (E-mail): sunduzgorgec@yahoo.com

genel cerrahi (%13) bölümlerinden gönderilen örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Suşların tamamı imipenem, meropenem ve amikasinine duyarlı olarak saptanmış; tüm izolatların sefotaksim ve seftriaksona dirençli olduğu izlenmiştir. Sefoksitin, ertapenem, sefoperazon/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, siprofloksasin, sefepim, amoksisilin/klavulanik asit, aztreonam ve seftazidime duyarlılık oranları ise sırasıyla; %96, %83, %63, %61, %50, %41, %25, %21, %20 ve %18'dir. Çalışmaya alınan *E.coli* suşlarında CTX-M, TEM, OXA-2 grup, PER, SHV ve OXA-10 grup beta-laktamaz gen pozitifliği sırasıyla; %89.5, %59.2, %15.8, %14.5, %11.8 ve %3.9 olarak bulunmuş; izolatların hiçbirinde GES ve VEB beta-laktamaz genine rastlanmamış; 1 (%1.3) izolatta ise araştırılan genlerden hiçbirisi saptanmamıştır. PCR analizi sonucu, 25 izolatta TEM ve CTX-M genlerinin birlikte bulunduğu belirlenmiş; 20 izolatta yalnız CTX-M ve iki izolatta yalnız TEM geninin varlığı tespit edilmiştir. SHV geni hiçbir izolatta tek başına saptanmamıştır. PFGE yöntemi ile GSBL üreten izolatlar arasında belirgin bir klonal ilişki gözlenmemiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, hastanemizde nozokomiyal GSBL üreten *E.coli* suşları arasında CTX-M tipi enzimin yüksek sıklıkta olduğu gösterilmiş; GSBL pozitif suşların poliklonal olarak yayıldığı belirlenmiş ve baskın olan bir epidemik suş tanımlanamamıştır. Bununla birlikte, epidemik klonlar ile plazmidler arasındaki ilişkiyi açıklayacak plazmid analizi ve multilokus dizi tiplendirme yöntemleri ile daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*; beta-laktamaz; CTX-M; klonal ilişki.

ABSTRACT

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing microorganisms currently cause a major problem. Among these CTX-M beta-lactamase producing *Escherichia coli* has also disseminated worldwide as an important cause of both nosocomial and community-acquired infections. The aims of this study were to determine the prevalence of the beta-lactamase genes, antibiotic susceptibilities and clonal relationships of ESBL-producing nosocomial *E.coli* isolates. A total of 76 ESBL-producing *E.coli* strains isolated from urine (n= 26), blood (n= 25) and wound (n= 25) specimens of hospitalized patients identified as nosocomial infection agents according to the CDC criteria between June 2010-June 2011 were included in the study. Antibiotic susceptibilities of the isolates were detected by Kirby-Bauer disc diffusion method according to CLSI recommendations. ESBL production was tested by double disc diffusion method, and cefotaxime/cefotaxime-clavulanic acid E-test strips (AB Biodisk, Sweden) were used for indeterminate results. Presence of TEM, SHV, CTX-M, OXA-2 group, OXA-10 group, PER, VEB and GES beta-lactamase genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method was used for the detection of clonal relationships among the strains. Most of the ESBL-producing *E.coli* strains were isolated from samples of inpatients in intensive care (35%), internal medicine (16%) and general surgery (13%) units. All of the 76 strains were found susceptible to imipenem, meropenem and amikacin; however all were resistant to cefotaxime and ceftriaxone. The susceptibility rates of the isolates to cefoxitin, ertapenem, cefoperazone/sulbactam, piperacillin-tazobactam, gentamicin, ciprofloxacin, cefepime, amoxicillin-clavulanic acid, aztreonam and ceftazidime were 96%, 83%, 63%, 61%, 50%, 41%, 25%, 21%, 20% and 18%, respectively. Among *E.coli* isolates, the frequency of CTX-M, TEM, OXA-2 group, PER, SHV and OXA-10 group beta-lactamase genes were found as 89.5%, 59.2%, 15.8%, 14.5%, 11.8% and 3.9%, respectively, while none of the isolates were positive for VEB and GES beta-lactamase genes. In 1 (1.3%) strain none of the investigated genes were detected. PCR analyses of the isolates revealed that 25 harbored CTX-M and TEM genes together, while 20 harbored only CTX-M and two harbored only TEM genes. Single SHV gene was not detected in any of the isolates. PFGE demonstrated no major clonal relationship between ESBL-producing isolates. This study indicated that CTX-M type enzymes were highly endemic among ESBL-producing nosocomial *E.coli* strains in our hospital, with the polyclonal spread of ESBL-producing bacteria without any dominant epidemic clone. In conclusion, it was considered that further studies are needed to explain the relationship between epidemic clones and plasmids with the use of plasmid analysis and multilocus sequence typing methods.

Keywords: *Escherichia coli*; beta-lactamase; CTX-M; clonal relationship.

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonlarının mortalite, morbidite ve tedavi maliyeti üzerine artırıcı etkisi tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir sorundur. Hastane enfeksiyonu etkeni gram-negatif çomaklardan *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. ve *Escherichia coli* suşları, artan direnç oranları nedeniyle büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu suşlarda en sık gözlenen antibiyotik direnç mekanizması genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimidir¹. GSBL üreten *E.coli*, IDSA (Infectious Diseases Society of America) 2006 raporuna göre acil yeni antibakteriyel ajanlara ihtiyaç duyulan dirençli patojenler arasına girmiştir². İlk GSBL 1980'li yılların başlarında Atina'da bulunmuş olan TEM enzimidir. Bu enzimi kodlayan gen bölgesindeki 1-4 aminoasitlik değişimlerle, günümüzde 450'nin üzerinde farklı yapıda GSBL varyantı beta-laktamaz enzimleri saptanmıştır. Bu enzimlerin en önemlileri; SHV, TEM, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES ve OXA beta-laktamazlardır³.

GSBL'ler bazı bakterilerin kromozomal yapısında olmakla birlikte sıklıkla sonradan plazmidler aracılığıyla kazanılır. Toplumda plazmid ve integron aracılı yayılım özelliği gösteren bu enzimler tehlikeli boyutlara varacak şekilde nozokomiyal patojenlerin direnç oranlarını artırmıştır^{3,4}. Bu durumdan epidemik plazmidler ve özgül klonların yaygın olması sorumlu tutulmuştur. Epidemik plazmidlerde sıklıkla; TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 ve CTX-M-32 gibi GSBL enzimleri saptanmıştır⁵. Özellikle CTX-M gen prevalansındaki artış, pandemi tehlikesi olarak ifade edilmektedir ve CTX-M-15 gen pozitifliğinin tüm dünyada klonal bir şekilde yayılımı hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar için endişe verici bir durum oluşturmaktadır. Tüm dünya, bu konu ile ilgili gerekli epidemiyolojik araştırmaların yapılması ve uygun kontrol önlemlerinin alınması konusunda uyarılmış durumdadır⁶.

Ülkemizde GSBL ile ilgili moleküler çalışmalar son zamanlarda artmakla birlikte sınırlı sayıdadır. Hastanemizde ilk kez yapılan bu çalışma ile, GSBL üreten hastane kökenli *E.coli* izolatlarında beta-laktamaz gen tipleri, oranları ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve hastane enfeksiyonu etkeni olan izolatların klonal ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Haziran 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında hastanede yatan hastalara ait 26 idrar, 25 kan ve 25 yara örneğinden izole edilen ve CDC kriterlerine⁷ göre hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan toplam 76 *E.coli* suşu dahil edildi. Suşların %35'i yoğun bakım, %16'sı dahiliye, %13'ü genel cerrahi ve %35'i diğer bölümlerden gelen örneklerden izole edilmişti. Tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılığını belirlemek için; amoksisilin/klavulanik asit (AMC), seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM), sefoksitin (FOX), sefepim (FEB), imipenem (IPM), meropenem (MEM), ertapenem (ETP), sefoperazon/sulbaktam (SCF), piperasilin/tazobaktam (TZP), amikasin (AMK), gentamisin (GEN), siprofloksasin (CIP) ve trimetoprim/sülfametoksazol (SXT) ticari antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. Suşların antibiyotik duyarlılıkları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine⁸ göre Kirby-Bauer

disk difüzyon (DD) yöntemiyle araştırıldı. Bakterilerde GSBL varlığı çift disk sinerji testi (ÇDST) ile saptandı. Şüpheli durumlarda sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit (CTX/CTL) E-test şeritleri (AB Biodisk, İsveç) ile doğrulama yapıldı⁹.

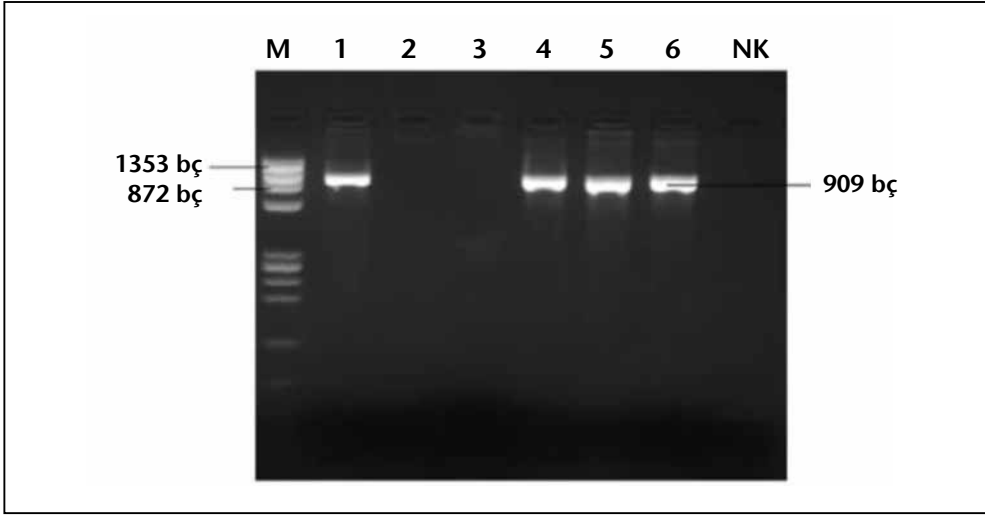
GSBL enzimlerinin moleküler yöntemlerle saptanması için suşlar Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine pasajlandı. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 1 ml steril distile su içerisinde 4 McFarland bulanıklığında süspans edildi. Daha sonra kuru ısı bloğunda (Wealtec Corp., ABD) 90°C'de 30 dakika kaynatıldı. 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant amplifikasyon için kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı. Uyumsuz sonuçlar için silika membran yöntemi (Qiagen GmbH, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda ekstraksiyon tekrarlandı.

Her bir suş için TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, OXA-2 grup, OXA-10 grup gen bölgelerine özgül primer setleri kullanılarak (Tablo 1), GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) cihazında 95°C'de 10 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 57°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama ile toplam 35 döngü ve son uzama olarak 72°C'de 3 dakika olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. Amplifiye edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntüledi. Her bir gen için bant büyüklükleri, DNA moleküler ağırlık standardı (Roche, Almanya) ve negatif kontrol ile karşılaştırılarak yorumlandı (Resim 1)¹⁰.

Tablo 1. PCR için Kullanılan Primerler ve Amplikon Büyüklükleri

hedef gen bölgesi		Primer dizisi (5'→3')	Büyüklik (bp)
TEM	F	TCCGCTCATGAGACAATAACC	931
	R	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	
SHV	F	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	868
	R	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	
CTX-M	F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	909
	R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC	
OXA-2 Grup	F	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	478
	R	CCACTCAACCCATCCTACCC	
VEB	F1	GATAGGAGTACAGACATATG	914
	R1	TTTATTCAAATAGTAATTCCACC	
PER	F	ATGAATGTCATCACAAAATG	927
	R	TCAATCCGGACTCACT	
GES	F	ATGCGCTTCATTACGCAC	864
	R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
OXA-10 Grup	F	GTCTTTCGAGTACGGCATT	720
	R	ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	

* F: Forward; R: Reverse; bp: Baz çifti.



Resim 1. PCR ile CTX-M pozitif suşların jel elektroforez görüntüsü [M: Ağırlık belirteci (0.072-1.35 kbç); Hat 1, 4, 5, 6: CTX-M pozitif suşlar; NK: Negatif kontrol].

Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin tespit edilmesi için Durmaz ve arkadaşlarının¹¹ uyguladıkları PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) yöntemi kullanıldı. Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar aynı, aralarında 2-3 bant farkı olan izolatlar yakın, aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar muhtemel ilişkili ve ≥ 7 bant farkı olanlar ise ilişkizisiz olarak değerlendirildi¹¹.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık oranlarının karşılaştırılmasında Fisher'in kesin ki-kare testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 76 *E.coli* suşunun hepsi (%100) IPM, MEM ve AMK'ye duyarlı olarak saptanmış; tüm suşların (%100) CTX ve CRO'ya dirençli olduğu izlenmiştir. Diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları ise; FOX'a %96, ETP'ye %83, SCF'ye %63, TZP'ye %61, GEN'e %50, CIP'a %41, FEB'e %25, AMC'ye %21, ATM'ye %20 ve CAZ'ye %18 olarak belirlenmiştir. MEM ve IPM ile ETP duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.05$). AMC'ye göre TZP ve SCF duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktür ($p < 0.0001$). Ayrıca çalışmada, CAZ, FEB ve ATM duyarlılıkları düşük saptanmış olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

E.coli suşlarında saptanan CTX-M, TEM, OXA-2 grup, PER, SHV ve OXA-10 grup beta-laktamaz gen oranları Tablo II'de gösterilmiştir. Hiçbir suшта GES ve VEB beta-laktamaz geni saptanmamıştır. Sadece bir suшта ÇDST ve E-test ile GSBL üretimi fenotipik olarak saptanmasına rağmen, araştırılan genlerden hiçbirisi bulunmamıştır (Resim 1).

Tablo II. *E.coli* İzolatlarının Beta-Laktamaz Gen Oranları

Beta-laktamaz geni	Pozitif sayı (%)
CTX-M	68 (89.5)
TEM	45 (59.2)
OXA-2 grup	12 (15.8)
PER	11 (14.5)
SHV	9 (11.8)
OXA-10 grup	3 (3.9)
VEB	0
GES	0

Tablo III. İzolatlarda Saptanan Gen Birliktelikleri

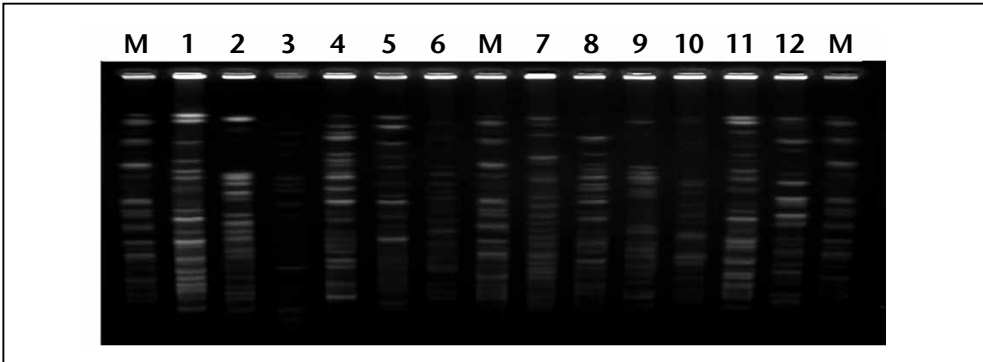
Beta-laktamaz geni	Sayı (%)
TEM/CTX-M	25 (33.7)
Yalnız CTX-M	20 (27)
TEM/CTX-M/PER	6 (8.1)
OXA-2 grup/CTX-M	4 (5.4)
TEM/SHV/CTX-M	3 (4)
TEM/CTX-M/OXA-2 grup	3 (4)
SHV/CTX-M/PER	2 (2.7)
Yalnız TEM	2 (2.7)
Yalnız SHV	0

Suşlar beta-laktamaz genlerinin birliktelikleri açısından incelendiğinde; yalnız CTX-M beta-laktamaz geni bulunduran suş sayısı 20, yalnız TEM beta-laktamaz geni bulunduran suş sayısı 2, TEM ve CTX-M beta-laktamazı birlikte bulunduran suş sayısı 25, TEM/SHV/CTX-M birlikteliği gösteren suş sayısı ise üç olarak saptanmıştır. Yalnız SHV geni bulunduran suş saptanmamıştır (Tablo III).

Suşlarda GSBL enzimlerinin varlığına göre CIP duyarlılığı, TEM/CTX-M birlikteliğinde %44 iken, yalnız CTX-M geni bulunduranlarda %25 olarak saptanmış; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Tüm beta-laktamaz/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının duyarlılığı; TEM/CTX-M birlikteliği olan suşlarda, yalnız CTX-M bulunduran suşlara göre daha düşük saptanmış ve yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0.05$). TEM/CTX-M bulunduran suşlarda CTX'e, yalnız CTX-M bulunduran suşlarda ise CRO ve CTX'e duyarlılık saptanmamıştır (Tablo IV).

Tablo IV. Yalnız TEM/CTX-M ve CTX-M Bulunduran İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Antibiyotik	Yalnız TEM/CTX-M	Yalnız CTX-M
	Sayı (%)	Sayı (%)
Ertapenem	19 (76)	16 (80)
Siprofloksasin	11 (44)	5 (25)
Amoksisilin/klavulanik asit	3 (12)	3 (15)
Piperasilin/tazobaktam	13 (52)	14 (70)
Sefoperazon/sulbaktam	13 (52)	15 (75)
Seftazidim	4 (16)	3 (15)
Sefepim	5 (20)	6 (30)
Aztreonam	5 (20)	4 (20)
Seftriakson	1 (4)	0
Sefotaksim	0	0

**Resim 2.** GSKL üreten *E.coli* suşlarının *XbaI* enzimi ile kesimin ardından oluşan PFGE bant profillerine ait örnekler (M: *E.coli* ATCC 25922 suşu PFGE belirteci).

Suşların PFGE yöntemine göre tiplendirilmesi sonucunda 69 farklı genotipik profil saptanmış; 14 (%19) suş yedi küme içinde yer almıştır. Baskın klon ya da salgın klonu tespit edilmemiştir. Küme içinde yer alan hastaların yaş profili, enfeksiyon tipi, örnek tipleri ve bölümleri birbirinden farklı olmakla birlikte, 6 kümede suşların epidemiyolojik ilişkileri muhtemel ilişkili olarak saptanmıştır. Sadece bir kümede yer alan iki adet suş yakın ilişkili olarak belirlenmiştir (Resim 2).

TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonlarının tipleri ve etkenleri, izole edildikleri bölüm ve bölgelere göre değişebilmektedir. Hastanemizde 1996 ve 2003 yıllarında yapılan çalışmalarda, hastane enfeksiyonu sıklıkla yoğun bakım, genel cerrahi, yenidoğan ve ortopedi bölümlerinde tespit edilmiş; izole edilen mikroorganizmalar ise *Enterobacteriaceae* üyeleri,

Staphylococcus aureus ve *Acinetobacter* spp. olarak saptanmıştır^{12,13}. Çelik ve arkadaşları¹⁴ da hastane enfeksiyonlarını sıklıkla yoğun bakım bölümlerinde; *E.coli* ve *Pseudomonas* türlerinin etken olduğu dolaşım ve solunum sistemi enfeksiyonları olarak saptamışlardır. Bu çalışmada da, söz konusu çalışmalarla uyumlu olarak GSBL üreten *E.coli* izolatları en sık yoğun bakım bölümlerinden gönderilen idrar ve kan örneklerinden izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda CTX-M üreten *E.coli* suşları, toplum kaynaklı üriner sistem ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının önemli bir sebebi olarak saptanmıştır⁶. Epidemik CTX-M tipi GSBL, günümüzde *E.coli* ve diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde artarak gözlenmektedir. Amerika'da 2000 yılında yapılan bir çalışmada, CTX-M tipi genler %25 oranında bulunmuş, bu oran 2004 yılında %69'a yükselmiş ve en yaygın CTX-M-15 olmak üzere CTX-M-16, -8 ve -14 olarak saptanmıştır¹⁵. Tayland'da yapılan bir çalışmada, GSBL gen prevalansı CTX-M için %99.3, TEM için %77, SHV için %3.8, VEB-1 için %8.5 ve OXA-10 için %8.1 olarak saptanmış, izolatların hiçbirisinde PER ve GES genleri tespit edilmemiştir¹⁰. İzolatlar arasında majör klonal ilişki saptanmayan bu çalışmada, CTX-M geni taşıyan izolatların Tayland'da oldukça yüksek endemisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰.

Ülkemizde Gür ve arkadaşlarının¹⁶ *E.coli* izolatlarında yapmış oldukları GSBL gen taramalarında CTX-M beta-laktamaz geni %71.4, TEM beta-laktamazı %49.4, SHV beta-laktamazı ise %46.7 olarak saptanmıştır. Gönüllü ve arkadaşları¹⁷ farklı GSBL enzimleri bulunduran, klonal olarak birbirine benzemeyen *E.coli* izolatlarında %86.8 oranında CTX-M-1 grubu enzimleri saptamışlar ve yaptıkları dizi analizi, plazmid analizi ve transkonjugasyon çalışmalarında CTX-M-1-grup bulunduran tüm izolatları CTX-M-15 ve *ISEcp1* insersiyon elementi ile ilişkili bulmuşlardır. Öksüz ve arkadaşları¹⁸ ise GSBL üreten *E.coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamaz oranlarını sırasıyla %66.7, %25 ve %83.3 olarak saptamışlardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, hastane ve toplum kökenli izolatlar arasında anlamlı bir fark olmayacak şekilde CTX-M gen prevalansı %92.5 ve %95.7 olarak yaygın bulunmuştur¹⁹. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, ülkemiz ve dünya genelinde yayınlanan oranlara benzer şekilde CTX-M oranları %89.5 olarak yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda izolatların 20'sinde CTX-M geni tek başına GSBL geni olarak saptanmıştır. Bu durum, özellikle tüm dünyada bahsi geçen CTX-M pandemisinden hastanemizin de etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda GSBL üreten *E.coli*'de karbapenem direncine nadir de olsa rastlanmaktadır. Kiremitçi ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında, GSBL üreten *E.coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları %100, ertapenem duyarlılığı %97.5 olarak saptanmıştır. Kuzucu ve arkadaşları²¹ ise *E.coli* izolatlarında ertapeneme %99.2, imipenem ve meropeneme ise %100 duyarlılık saptamışlardır. Bizim çalışmamızda imipenem ve meropenem duyarlılığı, önceki çalışmalarla uyumlu olarak %100 bulunmuş; ancak ertapenem duyarlılığı %83 oranında daha düşük olarak saptanmıştır. Ertapenem ve diğer karbapenemler arasındaki duyarlılık farkı istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu durumdan, hastane enfeksiyonu etkeni izolatlarda yaygınlaşan karbapenemaz tipi beta-laktamazların ya da diğer direnç mekanizmalarının sorumlu tutulabileceği sonucuna varılmıştır.

GSBL üretimi ile birlikte kinolon, SXT ve gentamisin direncinde anlamlı düzeyde artış söz konusu olabilmektedir. İspanya'da GSBL üreten izolatlar ile yapılan çalışmada, kinolonlara olan direnç artışını gösterecek şekilde *qnr* genleri, CTX-M-9 ve SHV-12 ile aynı plazmidde saptanmıştır²². Yapmış olduğumuz bu çalışmada, kinolon direnci yalnız CTX-M geni bulunduran izolatlarda daha yüksek saptanmıştır.

GSBL üreten *E.coli* izolatlarının geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlılıkları değişmektedir. Hoban ve arkadaşlarının²³ 2004 yılında yapmış oldukları Asya, Avrupa ve Güney Amerika'nın dahil olduğu TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) çalışmasında, GSBL üreten *E.coli* için seftazidim, sefepim ve seftriakson duyarlılıkları sırasıyla %20.8, %50 ve %20.8 olarak saptanmıştır. Ülkemizde ise Zarakolu ve arkadaşları²⁴ sefepim ve seftazidim duyarlılığını sırasıyla %65 ve %63 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda, seftazidim ve sefepim duyarlılığı tüm izolatlar için %18 ve %25 gibi düşük oranlarda saptanmakla birlikte, artan CTX-M gen oranına paralel olacak şekilde hiçbir izolatta sefotaksim ve seftriakson duyarlılığına rastlanmamıştır.

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerine direnç, GSBL için özgül olmamakla birlikte; beta-laktamaz inhibitörlerinin tedavide sık kullanılması ve inhibitörlere direnç fenotipi gösteren TEM ve SHV kökenli enzimler nedeniyle gözlenebilmektedir^{3,4}. Kuzucu ve arkadaşlarının²⁴ çalışmasında TZP ve SCF duyarlılıkları sırasıyla %59.4 ve %66.5 olarak saptanmış; Tunçcan ve arkadaşları²⁵ ise TZP, SCF ve AMC duyarlılığını sırasıyla %77, %95 ve %45 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda TZP ve SCF duyarlılığı, Kuzucu ve arkadaşlarının²⁴ verilerine benzer şekilde sırasıyla %61 ve %64 olarak bulunmuş, AMC duyarlılığı ise %20 olarak saptanmıştır. TZP ve SCF duyarlılığı, AMC duyarlılığına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0.05$).

Inhibitörlere direnç gösteren TEM kökenli enzimlerin varlığı açısından beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına olan duyarlılık; TEM/CTX-M birlikteliği olan izolatlarda, yalnız CTX-M bulunduran izolatlara göre daha düşük saptanmıştır. Beta-laktamaz inhibitörlerine olan duyarlılığın azalmasından, beta-laktamaz enzimlerinden plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar, grup 2ber ve grup 2br beta-laktamazlar (CMY, CMT, IRT) ve inhibitörlere dirençli SHV enzimleri de sorumlu olabilir²⁶. Ancak çalışmamızda bu enzimleri kodlayan gen taramaları ve dizi analizi çalışmaları yapılmamıştır.

E.coli klasik olarak poliklonal bir patojen olmakla birlikte, multilokus dizi tiplendirmesi (MLST) ile ST131 olarak tanımlanan epidemik CTX-M-15 üreten *E.coli* suşunun klonal yayılımı, GSBL üretiminin son yıllarda artış göstermesinin majör bir nedeni olarak sunulmaktadır. Yakın zamanda yapılmış çalışmalara göre Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da sekiz ülkeden elde edilen hastane ve toplum kaynaklı izolatlarda CTX-M-15 üreten *E.coli* suşlarının klonal görünümünün oldukça benzer olduğu gösterilmiştir²⁷. Mendonça ve arkadaşlarının²⁸ yapmış olduğu bir çalışmada, toplum kökenli izolatlar ile farklı hastanelere ait izolatlar %80 oranında birbirine benzeyen klonlar olarak saptanmıştır. Bu çalışma; ülkede çoğul ilaca dirençli CTX-M-14 ve CTX-M-15 bulunduran klonun yaygınlığının bir göstergesi olarak sunulmuştur. İspanya'da enfeksiyon ya da kolonizasyon etkeni GSBL üreten *E.coli* izolatları ile yapılan bir çalışmada, tüm izolatlar birbirlerinden oldukça farklı

olarak saptanmış ve direnç genlerinin izolatlar arasında plazmidler ile aktarılmış olabileceği sonucuna varılmıştır²⁹. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, yedi adet küme saptanmakla birlikte baskın klon ya da salgın klonu tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak, hastanemizde nozokomiyal *E.coli* izolatları ile yapılan beta-laktamaz gen taramalarında CTX-M oldukça yüksek sıklıkta saptanmıştır. GSBL üreten *E.coli* suşlarında farklı PFGE profili izlenmiştir. Bu durum hastane kökenli izolatlarda direnç genlerinin mobil ekstra-kromozomal DNA elemanları ile aktarılmış olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte dünyada yaygın olan ST131 gibi epidemik klonlarda, CTX-M geni ve plazmidler arasındaki ilişkiyi açıklayacak plazmid analizi ve multilokus dizi tiplendirmesi gibi daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Gürler N. Hastane enfeksiyonlarına yol açan sorunlu mikroorganizmalar nelerdir? Sorun oluşturma nedenleri nelerdir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 20-24 Nisan 2005, Samsun. Kongre Kitabı, s: 690-701.
2. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2006; 42(5): 657-68.
3. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4): 657-86.
4. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 933-51.
5. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Euro Surveill 2008; 13(47): pii: 19044.
6. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol 2006; 9(5): 466-75.
7. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control 1988; 16(3): 128-40.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. Document M100-S20-U, 2010. CLSI, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19, 2009 CLSI, Wayne, PA.
10. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2818-24.
11. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Jpn J Infect Dis 2009; 62(5): 372-7.
12. Durmaz B, Sönmez E, Tekerekoğlu MS, Aksüllü N. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde hastane enfeksiyonları; mikroorganizmalar ve çoklu antimikrobiyal direnç. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 1996; 3(3): 183-90.
13. Ersoy Y, Fırat M, Kuzucu Ç ve ark. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde hastane enfeksiyonları. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2003; 10(3): 133-7.
14. Çelik İ, Şenol A, Karlıdağ GE, İnci NA. Fırat Üniversitesi Hastanesi 2006 yılı hastane enfeksiyonları surveyans sonuçları. Fırat Tıp Derg 2009; 14(4): 242-6.

15. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(11): 4015-21.
16. Gür D, Gülay Z, Akan OA, 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(4): 537-44.
17. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, 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(3): 1110-2.
18. Öksüz L, Gürlü N. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(2): 183-94.
19. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Detection of *bla* (CTX-M) beta-lactamase genes in extended-spectrum beta-lactamase producing gram-negative bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(2): 187-96.
20. Kiremitçi A, Dinleyici EC, Erben N, et al. In vitro activity of ertapenem and other carbapenems against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care center in Turkey. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(9): 1441-9.
21. Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Investigation of the susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains to ertapenem and other carbapenems. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 28-35.
22. Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, et al. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 291-5.
23. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, et al. In vitro activity of tigecycline against 6792 gram-negative and gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52(3): 215-27.
24. Zarakolu P, Haşçelik G, Unal S. Antimicrobial susceptibility pattern of nosocomial gram-negative pathogens: results from MYSTIC study in Hacettepe University Adult Hospital (2000-2004). *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(3): 147-54.
25. Tunçcan ÖG, Keten DT, Dizbay M, Hızal K. Hastane kaynaklı *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılığı. *ANKEM* 2008; 22(4): 188-92.
26. Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 53-62.
27. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 273-8.
28. Mendonça N, Leitão N, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6): 1946-55.
29. Peña C, Gudiol C, Tubau F, et al. Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(3): 279-84.