

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**FARKLI ŞEHİRLERDE İZOLE EDİLEN
ENTEROBACTERIACEAE ÜYELERİNDE CTX-M
TİPİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-
LAKTAMAZ ÜRETİMİ VE MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Gülfem Terek

Uzmanlık Tezi

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİMDALI

**FARKLI ŞEHİRLERDE İZOLE EDİLEN
ENTEROBACTERIACEAE ÜYELERİNDE CTX-M
TİPİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-
LAKTAMAZ ÜRETİMİ VE MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Zeynep Gülay

Dr. Gülfem Terek

Bu araştırma D.E.Ü. Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 04.KB.SAĞ.034 sayı ile desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep Gülay’a, Anabilim Dalı Başkanı ve Dekanımız Sayın Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu ve diğer tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarım ve personelimize, ayrıca desteği ve anlayışı için aileme teşekkür ederim. Ayrıca çalışma sırasında suş göndererek çalışmaya katkıda bulunan değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Çiğdem Bal (İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Suna Gedikoğlu (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Deniz Gür (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi), Prof. Dr. İftihar Köksal (Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Cüneyt Özakin (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Mehmet Ali Özinel (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Bülent Sümerkan (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi)’a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ.....	5
2. AMAÇ:	8
3. GENEL BİLGİLER:	9
3.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	10
3.2. Beta – Laktam grubu Antibiyotiklere direnç gelişimi.....	14
3.2.1. Dış membran porin değişiklikleri ve/veya aktif pompa sistemleri ile ilacın uzaklaştırılması	14
3.2.2. İlacın hedefi olan Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP)’lerde Oluşan Değişiklikler	15
3.2.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi	16
3.3. Beta – Laktamaz yapısı ve sınıflandırılması :	17
3.3.1. A Sınıfı Beta- Laktamazlar	18
3.3.1.1. İnhibitör – dirençli beta-laktamazlar:	19
3.3.1.2. TEM ve SHV dışı grup A enzimler:	19
3.3.1.3. Karbapenemleri hidrolize eden Sınıf A beta-laktamazlar :	20
3.3.2. B Sınıfı Beta- Laktamazlar	20
3.3.3. C Sınıfı Beta-Laktamazlar:	22
3.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar:	23
3.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayılım Yolları	24
3.4.1. Transformasyon:	24
3.4.2. Transdüksiyon:	24
3.4.3. Plazmidler	25
3.4.4. Transpozonlar	25
3.4.5. İntegronlar	26
3.5. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazların Epidemiyolojisi:	26
3.5.1. Avrupa :	27
3.5.2. Kuzey Amerika:	27
3.5.3. Güney ve Orta Amerika	28

3.5.4. Afrika ve Orta Doğu ülkeleri.....	28
3.5.5. Avusturalya.....	29
3.5.6. Asya.....	29
3.6. CTX-M Grubu Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar	29
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. Suşlar	33
4.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler.....	33
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Sefotaksim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi	33
4.3.1. Çalışmaya alınan suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:.....	33
4.3.2. CTX-M pozitif suşların minimal inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi:	34
4.4. CTX-M Enziminin Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Yöntemiyle Araştırılması	34
4.4.1. Bakteri DNA eldesi:	34
4.4.2. PZT reaksiyonu:	35
4.4.2.1. PZT reaksiyon karışımının hazırlanması:.....	35
4.4.2.2. PZT ürünlerinin görüntülenmesi:	35
4.5. GSBL-Pozitif <i>Enterobacteriaceae</i> üyesi bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin PZT ile Araştırılması.....	35
4.6. CTX-M Üreten İzolatların Klonal Yakınlıklarının ERIC-PZT ile Araştırılması	38
4.6.1. ERIC-PZT'nin uygulanması:.....	38
4.6.2. İzolatların klonal yakınlıklarının araştırılması ve dendogram çizilmesi:	39
4.7. GSBL üreten suşlarda İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle beta-laktamazların saptanması:.....	39
4.8. CTX-M Enziminin Aktarılabirliğinin İncelenmesi	40
4.8.1. Konjugasyon Deneyleri:.....	40
4.8.2. Plazmid İzolasyonu:	41
4.9. DNA Dizi Analizi.....	41
4.10. PZT Yöntemiyle CTX-M ailesinden diğer GSBL'lerin araştırılması	41
5. BULGULAR	42

5.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları:	42
5.2. PZT Yöntemiyle CTX-M Enziminin Saptanması.....	47
5.3. CTX-M Üreten İzolatların Klonal Yakınlıkları.....	49
5.3.1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	50
5.3.2. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	51
5.3.3. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	52
5.3.4. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	53
5.3.5. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	54
5.3.6. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	55
5.3.7. İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:	56
5.3.8. Tüm merkezlere ait CTX-M pozitif izolatlar:	57
5.4. CTX-M Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması	59
5.5. GSBL-Pozitif <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin Varlığı	59
5.6. CTX-M Enziminin Aktarılabirliği.....	62
5.6.1. Konjugasyon Deneyleri	62
5.6.2. Plazmid İzolasyonu	62
5.7. PZT Yöntemiyle CTX-M-1 dışındaki CTX-M grubu Enzimlerin Saptanması	65
5.8. Dizi analizi ile seçilen ve <i>bla</i>_{CTX-M} Geni Taşıdığı Saptanan Suşların, Sefotaksim MİK Değerleri.....	65
5.9. DNA Dizi Analizi.....	65
6. TARTIŞMA.....	69
7. SONUÇ :.....	77
KAYNAKLAR.....	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Beta-laktamazların sınıflandırılması	17
Tablo 2: CTX-M grubu enzimler	31
Tablo 3: CLIS M100-S16 standardına göre <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri için seçilen beta-laktam antibiyotiklerin zon çapları.	34
Tablo 4: CTX-M PZT reaksiyon karışımı	35
Tablo 5: <i>blaTEM</i> ve <i>bla SHV</i> PZT reaksiyon karışımı	36
Tablo 6: PZT ve dizi analizi için kullanılan oligonükleotid dizileri	37
Tablo 7: CTX-M, TEM ve SHV için PZT reaksiyonları	38
Tablo 8: ERIC-PZT reaksiyon karışımı	39
Tablo 9a : Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	43
Tablo 9b: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden seçilen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	43
Tablo 9c: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri.	44
Tablo 9d: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	45
Tablo 9e: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	46
Tablo 9f: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	46

Tablo 9g: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri	47
Tablo 10: Merkezlere ve türlere göre CTX-M enzimi saptanan suşların dağılımı ve yüzdesi.	48
Tablo- 11a: Farklı merkezlere göre <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinde beta-laktamaz enzimlerinin dağılımı	61
Tablo 11b: Genel <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} oranları	62
Tablo 12: İzolatlar ve plazmid içerikleri	64
Tablo 13: Dizi analizi için seçilen suşların sefotaksim MİK değerleri	65

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1a-1d: Başlıca beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapıları	11
Şekil 2: Bakteri hücre duvarı formasyonu sırasında oluşan unit yapı. Şekilde hücre duvar yapısında disakkarid pentamuropeptid yapısı gösterilmiştir	13
Şekil 3 : Bakteri hücre duvarında peptid zincirleri arasındaki bağlantı (transpeptidasyon).....	13
Şekil 4: Gram negatif hücre duvar yapısında beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimine yol açan farklı mekanizmalar	16
Şekil 5: Sınıf A TEM beta-laktamazın tersiyer yapısı	18
Şekil 6 : CTX-M enziminin coğrafi dağılımına ilişkin şekil.....	31
Şekil 7: GSBL paterni gösteren bir <i>E.coli</i> suşu	42
Şekil 8: CTX-MA ve CTX-MB primerleriyle yapılan PZT sonucu elde edilen ürünler.....	48
Şekil-9 : <i>Enterobacteriaceae</i> ailesine ait suşlarının ERIC-PZT sonuçları	49
Şekil 10a-10b: Hacettepe Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (10a) ve dendogram (10b)	50
Şekil 11a-11b: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne (DEÜTF) ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel (11a)görüntüsü ve dendogramı (11b).....	51
Şekil 12a-12b: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların (12a) ERIC-PZT jel görüntüsü ve dendogram (12b)	52
Şekil 13a-13b : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (13a) ve dendogramı (13b)	53
Şekil 14a-14b: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (14a) ve dendogramı (14b).....	54
Şekil 15a-15b : Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (15a) ve dendogramı (15b).....	55
Şekil 16a-16b : İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (16a) ve dendogramı (16b)	56
Şekil 17a ve 17b : Merkezlere ait tüm CTX-M pozitif izolatların dendogramı	57-58

Şekil-18: İzoelektrik noktaları bilinen, CTX-M, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen bazı izolatların İEO jeli görüntüsü pI: İzoelektrik nokta	59
Şekil- 19: Özgül primerlerle TEM grubu enzim geni saptanan bazı <i>Enterobacteriaceae</i> üyesi suşlar.....	60
Şekil- 20 : Özgül primerlerle SHV grubu enzim geni saptanan bazı <i>Enterobacteriaceae</i> üyesi suşlar.....	60
Şekil 21 : Plazmid jel görüntüsü	63
Şekil-22: Çeşitli merkezlere ait suşların dizi analizi yapılan bölgesine ait protein dizisinin, “Bioedit” programı yardımıyla CTX-M -3 ile karşılaştırılması	68

KISALTMALAR

GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
CTX-M	: Sefotaksimaz
PBP	: Penisilin Bağlayan Proteinler
6-APA	: 6-Amino Penisilanik Asit
7-ASA	: 7-Amino Sefalosporonik Asit
OMP	: “Outer Membrane Protein”
pI	: İzoelektrik Nokta
İEO	: İzo-Elektrik Odaklama
NCCLS	: “National Commmittee for Clinical Laboratory Standards”
CLSI	: “Clinical Laboratory Standards Institute”
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TEMED	: N,N,N,N, tetra metil etilendiamin
ERIC	: “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”
IS	: Insertion sequence
EB	: Etidyum Bromür
CTX	: Sefotaksim
FEP	: Sefepim
ATM	: Aztreonam
IPM	: İmipenem
CPD	: Sefpodoksim
AMC	: Amoksisilin-klavulanik asit
FOX	: sefoksitin
NAM	: N-asetil muramik asit
NAG	: N-asetilglukozamin

ÖZET

Farklı şehirlerde izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin ve moleküler epidemiyolojisinin incelenmesi

Amaç: Bu çalışmada Kasım 2002- Temmuz 2003 arasında ülkemizdeki 7 farklı merkezden izole edilen ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler arasında CTX-M (Sefotaksimaz) tipi GSBL üretiminin prevalansı, yayılımdan sorumlu genetik elemanların özellikleri ve CTX-M üreten suşların klonal yakınlıkları araştırılmıştır.

Yöntem: Çalışmada, Kasım 2002 – Temmuz 2003 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde izole edilmiş ve her merkez başına rastgele seçilmiş 10 izolat olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi 70 genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten izolat kullanılmıştır. Suşların tür dağılımı 31 *Escherichia coli*, 24 *Klebsiella pneumoniae*, bir *Klebsiella oxytoca*, dört *Enterobacter cloacae*, iki *Enterobacter aerogenes*, beş *Klebsiella ornitholytica*, iki *Proteus mirabilis* ve bir *Shigella sonnei* şeklindedir. İzolatlarda *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} varlığı Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ile araştırılmıştır. *bla*_{CTX-M} pozitif izolatlar arasından seçilen 21 suшта CTX-M enziminin tipi dizi analizi ile belirlenmiştir. CTX-M üreten bakterilerin klonal yakınlıkları Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus –PZT (ERIC PZT) yöntemiyle saptanmış, *bla*_{CTX-M}'in geçişinden sorumlu elemanın özelliklerini anlamak için, konjugasyon ve plazmid ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Sonuç: İncelenen izolatlarda sırasıyla *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} saptanma oranları %75.7, %81.4 ve % 91.4'tür. Türlerle göre dağılıma bakıldığında *E.coli* izolatlarının %77.4'ü *K.pneumoniae* izolatlarının %83.3'ü, *K.ornitholytica* izolatlarının %100'ü *E. aerogenes* izolatlarının %50'si, *E.cloacae* izolatlarının %50'si ile çalışmaya alınan tek *S.sonnei* izolatı CTX-M üretmektedir. *P.mirabilis* izolatlarında CTX-M saptanmamıştır. Dağılım merkezlere göre farklı olmakla birlikte CTX-M tipi enzim prevalansının % 50 (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi)-%100 (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) arasında değiştiği izlenmiştir. ERIC-PZT ile klonal ilişki değerlendirildiğinde merkezlerde ikili ve üçlü kümeleşmeler bulunmakla birlikte genel olarak farklı merkezlerden izole edilen suşlar

arasında klonal bir yayılım saptanmamıştır. Transkonjugasyon ve plazmid ekstraksiyon deneyleri ile *bla*_{CTX-M}, aktarımın 46-85 kb büyüklüğündeki plazmidlerle olduğu görülmüştür. Yapılan dizi analizi çalışması sonucunda tüm merkezlerde CTX-M-3 varlığı saptanmıştır.

Sonuç olarak CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ülkemizde özellikle *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Farklı merkezler arasında ortak bir klonun yayılımı söz konusu değildir.

Anahtar kelimeler: *Enterobacteriaceae*, CTX-M, epidemiyoloji, plazmid aracılıklı direnç, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

SUMMARY

Investigation of the prevalence and molecular epidemiology of CTX-M type extended spectrum beta-lactamase producers among *Enterobacteriaceae* family isolated in different cities

Objectives: To investigate the prevalence, of CTX-M type beta-lactamases and properties of the genetic elements responsible for the spread of these among the members of *Enterobacteriaceae* family which are extended spectrum beta-lactamase positive and isolated from seven different hospitals between November 2002-July 2003. Clonal relationship between CTX-M producers was also evaluated.

Methods: In this study *bla*_{CTX-M} presence was sought by PCR in 70 isolates which are third-generation cephalosporin resistant and members of *Enterobacteriaceae* family. Ten isolates per center were chosen randomly. Thirty two of these isolates were *Escherichia coli*, 24 were *Klebsiella pneumoniae*, three were *Klebsiella ornitholytica*, four were *Enterobacter .cloacae*, four were *Enterobacter aerogenes*, two were *Proteus .mirabilis* and one was *Shigella sonnei*. *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} presence was also sought by PCR. Direct sequencing of CTX-M positive PCR-products was performed on both strands and CTX-M enzyme type was determined. Clonal relationship of CTX-M producers was investigated by ERIC-PCR. Genetic location of *bla*_{CTX-M} was investigated by conjugation and plasmid extraction experiments.

Results and Conclusion: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} production rates were 75.7%, 81.4 % and 91.4%, respectively; among the study isolates species distribution of CTX-M producers was 77.4 % in *E.coli*, 83.3 % in *K.pneumoniae*, 50 % in *E. aerogenes* and *E.cloacae* isolates. The single *S.sonnei* isolate was also CTX-M positive. CTX-M prevalence varied between 50% (Uludağ University School of Medicine) to 100% (Hacettepe University School of Medicine) among centers. ERIC-PCR results revealed no clonal relationship between the isolates from different centers although there were clusters of two or three strains among isolates of a single center. Conjugation and plasmid analysis revealed that plasmids which had a molecular size of 46-85 kb were responsible from the transfer of *bla*_{CTX-M}. Sequence analysis has shown that all of the CTX-M positive isolates included in this study produced CTX-M-3. As a result prevalence CTX-M type extended spectrum beta-lactamases is high among *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates in our country. According to ERIC-PCR results

however clonal dissemination of existence of an outbreak of CTX-M beta-lactamase producers between different centers is not considered.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, CTX-M, epidemiology, plasmid –borne resistance, extended spectrum beta-lactamase

1. GİRİŞ

Beta-laktam antibiyotikler çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, bakterilerde beta-laktam direnci sık görülmektedir. Gram pozitif bakterilerde en sık görülen beta-laktam direnç mekanizması Penisilin Bağlayan Protein (PBP) değişimleri iken Gram negatif bakterilerde antibiyotiği inaktive eden beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir (1). Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç ilk beta-laktam türevi olan penisilinin klinik kullanıma girmesinden önce ortaya çıkmıştır. Birçok Gram negatif bakteri cinsi doğal olarak kromozomal genlerce kodlanan beta-laktamazlar üretmektedir (1).

Son yirmi yıllık dönemde çok sayıda yeni beta-laktam antibiyotik geliştirilmiş ancak tedaviye giren her yeni antibiyotikle birlikte farklı türde beta-laktamaz grupları da ortaya çıkmıştır (1).

Hastane ortamında bulunan bakterilerin toplum kökenli infeksiyon etkeni olan bakterilere göre daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bunun en önemli nedeninin özellikle son 35-40 yıl içinde geliştirilen antibiyotiklerin hastane ortamında yaygın olarak kullanılması olduğu düşünülmektedir. Tahmin edilebileceği gibi geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin tedavide sıkça kullanımı bu ajanlara direnç gelişimini kaçınılmaz kılmıştır (1).

Enterobacteriaceae üyeleri hastane kökenli infeksiyonlara en sık neden olan ve geliştirdikleri antibakteriyel direnç nedeniyle de adlarından en fazla söz ettiren etkenler arasındadır. Bu bakteriler, özellikle altta yatan ciddi hastalığı bulunan, yoğun bakım ünitesi ve hematoloji – onkoloji hastaları ile yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda ciddi infeksiyonlara yol açabilmektedir (1-3).

Başta *E.coli* ve *Klebsiella spp.* olmak üzere Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en sık gözlenen mekanizma sıklıkla plazmid kontrolünde olan beta-laktamaz enzimlerinin salınımıdır. Enterik bakterilerde bulunan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi geniş spektrumlu beta-laktamazlar sadece penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken; bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) adı verilen ve son kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen, plazmid, transpozon ve integronlarca taşınan beta-laktamazlar ortaya çıkmıştır (4).

Günümüzde GSBL'ler tüm dünyada hastanede yatan hastalar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. GSBL taşıyan bakterilerle infeksiyonda; hastanede kalış süresinin uzunluğu, hastalığın ağırlığı, entübasyon ya da mekanik ventilatöre bağlı olma, üriner ya da arteriyel kateterizasyon ve daha önce antibiyotik kullanmış olma gibi kriterler risk faktörü kabul edilmektedir (5,6).

İlk GSBL türevi enzim olan SHV-2 Almanya'dan bildirilmiştir (1). Aslında bu şaşırtıcı değildir çünkü geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler önce Batı Avrupa ülkelerinde kullanıma girmiştir. Ancak klinik kullanımın başlaması ve artmasıyla çok geçmeden Amerika ve Asya'da da yeni GSBL enzim tipleri görülmeye başlanmıştır (5).

Klinik izolatlar arasında GSBL prevalansı ülkeler ve hastanelere göre farklıdır. Bunda antibiyotik kullanımının etkili olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde bu oran %3 iken, Avrupa ülkelerinden Hollanda'da %3, Fransa'da *K.pneumoniae* izolatlarında %11.4 ve *E.aerogenes* suşlarında %47.7'dir (7). Özellikle Akdeniz ülkelerinde GSBL oranları oldukça yüksektir (8). 1997-1999 arası gerçekleştirilen SENTRY çalışması sonuçlarına göre global GSBL prevalansı %25'tir ve bu çalışmada Latin Amerika ülkelerinde GSBL oranının % 45 'i bulduğu görülmektedir (9).

GSBL üreten bakterilerin hastanemizde de sorun olduğu görülmektedir. Örneğin 1 Mayıs 2002- 31 Aralık 2005 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden soyutlanan *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL üretim oranı sayısı Mayıs 2002-Nisan 2003 döneminde %3 iken, ikinci yıl %9'a ve üçüncü yıl %14'e yükselmiştir. Aynı çalışmada, yıllar içerisinde özellikle *E.coli* ve *Enterobacter spp.* izolatlarında GSBL üretiminde artış gözlenmiştir (10). Daha önce yapılan çalışmalarda poliklinik kökenli izolatlarda GSBL varlığı gözlenmezken yukarıda belirtilen çalışmada dönemde toplum kökenli suşlarda yıllar arasında %4-7.4 oranında GSBL pozitifliği saptanmıştır (10). 2006 yılının ilk 10 aylık döneminde ise bu oran %11 olup, GSBL üreten toplum kökenli izolatlarda artış gözlenmektedir (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Bakterioloji laboratuvarı verileri).

GSBL'lerin çoğu TEM veya SHV türevi enzimlerdir. Ancak son yıllarda, bunların dışında diğer GSBL'lerin de önem kazandığı gözlenmektedir. Bu yeni enzimler arasında PER, CTX-M , VEB, SPM gibi enzimler ve enzim aileleri sayılabilir (6,11,12). Bu enzimler, TEM ve SHV beta-laktamazları ile aminoasit dizisi açısından en fazla % 40 benzerlik gösterirler.

İlk kez 1991 yılında Fransa'dan Bernard ve arkadaşları tarafından bildirilen ve plazmid kökenli yeni bir aile olarak tanımlanan CTX-M grubu GSBL'ler özellikle sefotaksimi parçalamaktadır (13). Bu sefotaksimazlar temel olarak *E.coli* ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da bulunmakla beraber diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de tanımlanmıştır (11). CTX-M enziminin en dikkat çekici özelliği toplum kökenli suşlardaki yaygınlığıdır (6,14). Merkezimizde yapılan bir çalışmada da bir *Shigella sonnei* dışkı izolatında CTX-M-3 saptanmış olup bu veri ile Türkiye'de ilk; dünyada ise üçüncü CTX-M-3 üreten *Shigella sonnei* izolatu olarak literatüre girmiştir (15). Hastanemizde yapılan bir başka çalışmada, Aralık 2001 – Şubat 2002 arası dönemde idrar kültürlerinden izole edilen 14 GSBL pozitif klinik *E.coli* izolatinin tümünde CTX-M-3 saptanmıştır (16). Ayhan ve arkadaşlarının çalışmasında (17) 2002-2004 arası dönemde Behçet Uz Çocuk Hastanesi'nden meydana gelen 7 farklı hastane salgınında izole edilen 81 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium suşunda %23 oranında CTX-M pozitifliği saptanmıştır. Bir başka çalışmada bu izolatların CTX-M-3 ürettikleri belirlenmiştir (18). Aktaş ve arkadaşları (19) ise İstanbul'da izole edilen bir *E.coli* suşunda CTX-M-3 gibi CTX-M-1 ailesinden bir enzim olan CTX-M-15 varlığını göstermişlerdir.

2.AMAC:

Ülkemizde beta-laktam direnç prevalansını ve enzim tiplerini araştıran çeşitli çalışmalar CTX-M grubu GSBL'lerin ülkemizde de giderek yaygınlaştığını göstermektedir ancak bu konuda bölgelere göre dağılımı ve enzim tiplerini gösteren çalışmaların sayısı kısıtlıdır.

Bu nedenle çalışmamızda; Kasım 2002- Temmuz 2003 arasında ülkemizdeki 7 farklı merkezden izole edilmiş olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler arasında CTX-M prevalansı, bundan sorumlu genetik elemanların özellikleri ve CTX-M üreten suşların klonal yakınlıkları araştırılmıştır.

3. GENEL BİLGİLER:

Antibiyotik direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde giderek artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni antibakteriyel ilaçların klinik tedaviye girmesi kaçınılmaz olarak bunlara dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile sonlanmaktadır (20).

1939'da penisilinler saf olarak elde edildiğinde büyük umutlar doğurmuş ancak hemen ardından 1940'da Abraham ve Chain'in penisilinazı bulması umutların kırılmasına neden olmuştur. Ardından bir çok yeni antibiyotik geliştirilmiş ancak bakteriler bulunan her antibiyotiğe farklı bir mekanizma ile direnç geliştirmeyi başarmıştır (21).

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin 1980'lerin başında klinik uygulamaya girmesi ile beta-laktamaz aracılıklı dirence karşı önemli bir aşama kaydedilmiş; ayrıca nefrotoksik etkisi olan aminoglikozit ve polimiksin grubu antibiyotiklere alternatif olarak bir tedavi seçeneği sağlanmıştır (6,22). Ancak bu grup antibiyotiklerin klinik tedavide yaygın kullanımı, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sorunun ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır.

Beta-laktam antibiyotikler günümüzde hastane enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Ancak bu durum bu gruba karşı gelişen direnci de arttırmaktadır. Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncinde önde gelen mekanizma beta-laktamaz üretimidir. Şimdiye dek 400'den fazla beta-laktamaz tanımlanmıştır (23,24).

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasını hidrolize ederek beta-laktam ajanları etkisiz hale getiren enzimlerdir (25). Beta-laktamazlar arasında klinik açıdan en önemli grup genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL). Çünkü bu enzimler tedavide yaygın olarak kullanılan üçüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamlara karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. GSBL prevalansı ülkeden ülkeye ve şehirden şehre değişmektedir. Bunların çoğunluğunu sınıf A serin beta-laktamazlar olan TEM ve SHV grubu GSBL'ler oluşturmaktadır. Bunların günümüzdeki sayısı 150'yi aşmıştır (24). Bu enzimler dışında GSBL aktivitesi gösteren başka beta-laktamazlar da tanımlanmıştır. Bunlar;

1- PER 1 ve 2 (26-28)

2- OXA ailesi (OXA-2 ve OXA-10 türevleri) (29,30)

3- CTX-M ailesi (CTX-M-1-64, TOHO-1 ve 2) (24,31,32)

4- Diğer (VEB-1-3 ailesi, BES-1, GES 1-9, SFO-1, TLA 1-2, IBC-1) (24,33-35)'dir.

İlk GSBL 1983 yılında Almanya’da bir *K. ozaenae* suşunda bildirilen SHV-2’dir (36). Günümüze kadar geçen 25 yıl içerisinde ise önce Avrupa ülkeleri, bunları takiben ABD ve Asya ülkelerinde GSBL üreten *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarına bağlı salgınlar bildirilmiştir (37). Özellikle Akdeniz havzası ülkelerinde GSBL prevalansı çok yüksektir (8). Prevalansın yüksek olmasında GSBL’lerin sıklıkla plazmid ve integron gibi hareketli elemanlarla ilişkili olması rol oynamaktadır.

Dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların sağaltımında çoğunlukla geniş spektrumlu beta-laktam ajanlar tek başına veya aminoglikozitler ve florokinolonlar ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanımlarına paralel olarak direnç gelişimi de sıktır. Ülkemizde hastane kökenli Gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotik gruplarına duyarlılıklarını inceleyen çok merkezli çalışmalarda, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ile florokinolonlara direncin önemli boyutlara ulaştığı görülmektedir (38). Gram negatif bakteriler arasında GSBL üretim oranları ülkeden ülkeye, şehirden şehire, hastaneden hastaneye ve hatta aynı hastanedeki servisler arasında değişmektedir. GSBL’si bulunan ve bulunmayan bakterilerle meydana gelen infeksiyonlar, mortalite, morbidite ve sağlık giderleri açısından karşılaştırıldığında; ilk tedavi olarak karbapenemlerin kullanıldığı hastalar hariç, GSBL üreten suşlarla gelişen infeksiyonlarda mortalitenin daha yüksek ve yatış süresinin daha uzun olduğu gözlenmektedir (39) ve bu durum ülkemiz için de önemlidir.

3.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Beta-laktam grubu antibiyotikler (penisilin, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler), günümüze dek geliştirilen en güvenli ve yaygın kullanılan antibiyotik sınıfları arasındadır (11). Tüm beta-laktam antibiyotiklerde, dört üyeli ortak bir beta-laktam halkası bulunur. Monobaktamlar hariç bu halkaya ikinci bir halka eklenmiş durumdadır (Şekil-1a-1d). Penisilin ve benzerlerinde bu iki halkalı yapıya 6-amino penisilanik asit (6-APA), sefalosporinlerde ise 7-amino sefalosporanik asit (7-ASA) adı verilir. Kimyasal yapılarına göre beta-laktam ajanlar üç ana grup altında toplanabilir (40):

i) Beta-laktam halkası ve beş üyeli yan zincir içerenler:

Penam: Penisilinler, sulbaktam, tazobaktam

Klavam: Klavulanik asit

Karbapenem: İmipenem, meropenem, tienamisin

ii) Beta-laktam halkası ve altı üyeli yan zincir içerenler:

Sefem: Sefalosporinler, sefamisinler

Oksasefem: Moksalaktam

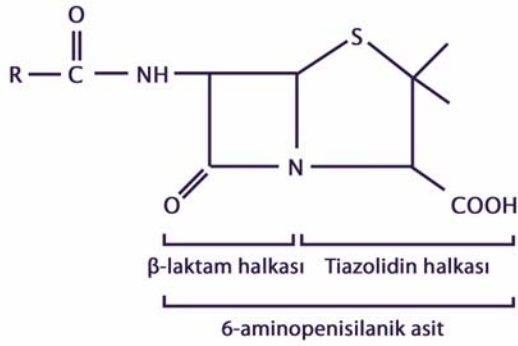
Karbasefem: Lorakarbef

iii) Tek bir beta-laktam halkası içerenler:

Monobaktam: Aztreonam

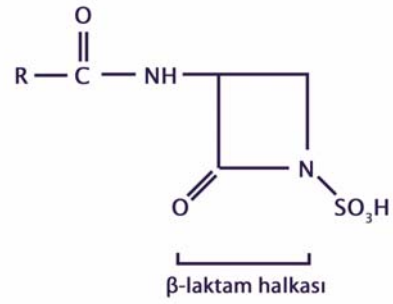
Araştırma aşamasında olanlar: Monokarbam ve monosulfaktam

Penisilinler



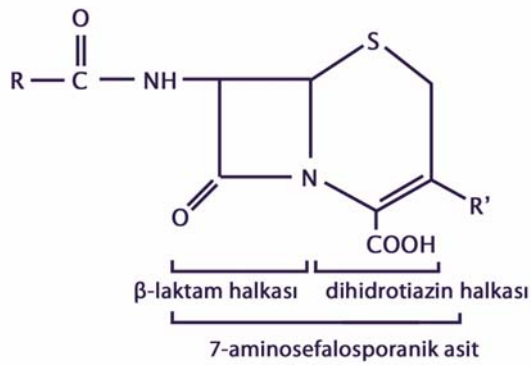
Şekil 1a : Penisilin grubu beta-laktam ajanların kimyasal yapısı

Monobaktamlar



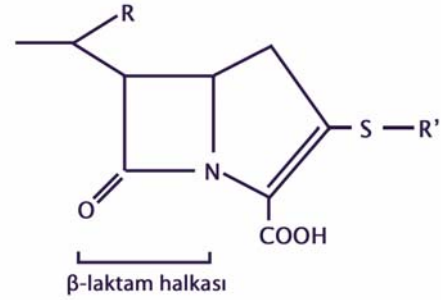
Şekil 1b: Monobaktam grubu beta-laktam ajanların kimyasal yapısı

Sefalosporinler



Şekil 1c : Sefalosporin grubu beta-laktam ajanların kimyasal yapısı

Karbapenemler



Şekil 1d: Karbapenem grubu beta-laktam ajanların kimyasal yapısı

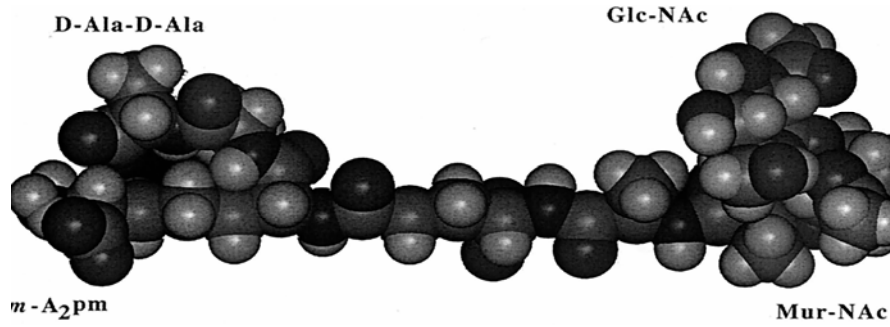
Beta-laktam antibiyotikler peptidoglikan sentezinin transpeptidasyon basamağından sorumlu Penisilin Bağlayan Proteinleri (PBP) inhibe ederek işlev görür (40,41).

Bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka bakteri hücrelerini osmotik lizisten korur, bakteri hücrelerine sertlik ve şekil verir. Bunun dışında hücre bölünmesi ve çoğalması ile ilgilidir. Peptidoglikan tabaka hücre duvarı olmayan mikoplazma ve ureaplazmalar hariç diğer tüm bakterilerde bulunmaktadır (42).

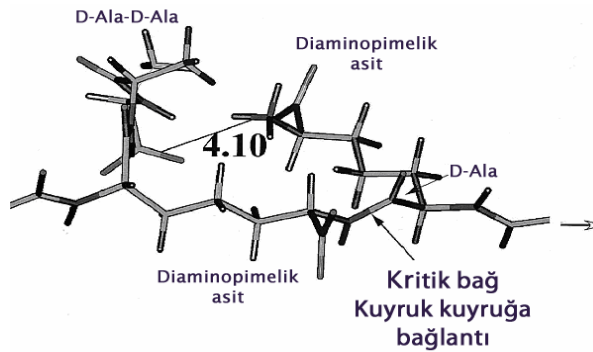
Peptidoglikan (murein) biyosentezi birçok basamaktan oluşur ve sitoplazmada başlayıp hücre membranının dış yüzünde sonlanır. İlk aşamada nukleotid şeker-bağlantılı prekürsörler UDP-N-asetil-glukozamin (UDP-GlcNAc) ve UDP-N-asetil muramil pentapeptid (UDP-MurNac-pentapeptid) sentezlenir. Sitoplazmik membranda meydana gelen ikinci safhada ise prekürsörler lipid taşıyıcı olan undekaprenole ve sonra birbirlerine bağlanır ve sitoplazmik membranın dış yüzeyine taşınırlar. Lipid taşıyıcı undekaprenol ise disakkarid ünitesinden ayrılır ve fosforil grubunu kaybederek yeni ünitelerin taşınması için rejenere olur. Sentezin üçüncü ve son aşaması sitoplazmik membranın dış kısmında meydana gelir. Bu aşamada yeni sentezlenen disakkarid peptid ünitelerin peptidoglikan tabakaya eklenmeleri söz konusudur. Bunun için gerekli transglikozilasyon ve transpeptidasyon tepkimeleri hücre membranının dış yüzeyinde bulunan PBP'ler tarafından katalizlenir. PBP'lerin bazıları hem transglikozilasyon hem transpeptidasyon reaksiyonlarını yürüten çift işlevli PBP'lerdir. Bazı PBP'ler ise sadece transpeptidaz aktivitesi gösterirler. Transpeptidasyon reaksiyonunu katalize eden transpeptidazlar, hücre membranında bulunur. Transpeptidazlar haricinde karboksipeptidazlar da minör PBP'leri oluştururlar. PBP'ler, en yüksek molekül ağırlığı olan "1" numara olacak şekilde adlandırılırlar (42).

Transpeptidasyon sırasında, bir zincirdeki bir NAM'a bağlı pentapeptidin son iki aminoasiti olan D-Ala-D-Ala arasındaki bağ parçalanır, enzim-substrat ara ürünü meydana gelir ve son D-Alanin aminoasiti serbest kalır. Bu parçalanma ile transpeptidasyon için gerekli enerji sağlanır. İkinci aşamada ise peptidil grubu akseptör moleküle transfer edilir. Akseptör molekül bir diğer pentapeptiddeki 3. pozisyonunda bulunan bir dibazik aminoasittir (Örneğin *E.coli*'deki diaminopimelik asit, *S. aureus*'taki L-lizin vb.). Sonuçta donör peptidin D-alanin yapısı ile akseptör peptidin 3. amino grubu arasında bir çapraz bağ (4'→3') meydana gelir (41,43).

Beta-lakam antibiyotiklerin etki mekanizması moleküler benzerlik temeline dayanır. Penisilin ve sefalosporinlerin moleküler yapısı, peptidoglikan zincirindeki pentapeptidlerin terminalinde yer alan D-alanil D-alanin'e yapısal benzerlik gösterir. Bu nedenle, PBP'ler beta-lakam ajanlarla bağlanırlar. Oluşan açıl enzim türevi, su moleküllerinin aktif bölgeye uzaklığı nedeniyle birbirinden ayıramaz ve enzim inhibe olur. Bunun sonucunda peptidoglikan zincirinin sentezi durur ve otolizinlerin devreye girmesiyle hücre ölümü gerçekleşir. PBP'lerin değişik beta-lakam ajanlara karşı afiniteleri farklıdır. Ajanın birden çok PBP'ye bağlanabilmesi bakterisidal aktiviteye katkıda bulunur (42).



Şekil 2: Bakteri hücre duvarı formasyonu sırasında oluşan unit yapı. Şekilde hücre duvar yapısında disakkarid pentamuropeptid yapısı gösterilmiştir (45 nolu kaynaktan alınmıştır).



Şekil 3 : Bakteri hücre duvarında peptid zincirleri arasındaki bağlantı (transpeptidasyon) (45 nolu kaynaktan alınmıştır).

3.2. Beta – Laktam grubu Antibiyotiklere direnç gelişimi

Beta-laktam grubu antibiyotiklerin çok yaygın kullanılmaları sonucunda, bu grup antibiyotiklere karşı önemli oranda direnç gelişimi gözlenmiştir. Beta laktam direncinden sorumlu üç değişik mekanizma bulunmaktadır. Bunlar:

3.2.1. Dış membran porin değişiklikleri ve/veya aktif pompa sistemleri ile ilacın uzaklaştırılması

3.2.2. İlacın hedefi olan PBP'lerdeki değişiklikler

3.2.3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesidir.

Dirençli bakterilerde bu mekanizmalar tek başlarına; daha sıklıkla da bir veya ikisi beraberce dirence yol açmaktadır.

3.2.1. Dış membran porin değişiklikleri ve/veya aktif pompa sistemleri ile ilacın uzaklaştırılması

Beta-laktam antibiyotikler, Gram-negatif bakterilerdeki hedeflerine ulaşabilmek için dış dış membrandan dış membran proteini (Outer Membrane Protein; OMP) adı verilen ve porin proteinlerinden oluşan kanallar yoluyla geçmektedir. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile; antibiyotiğin elektriksel yük, çözünürlük, moleküler büyüklük gibi, çeşitli özellikleri beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Beta-laktam antibiyotikler açısından *E.coli*'deki en önemli dış membran proteinleri OmpF ve OmpC'dir. Bazı dış membran porinleri, bazı beta-laktamlar için özeldir. Örneğin *P.aeruginosa*'da OprD değişimleri veya kaybı karbanenemlere direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Yine *P. aeruginosa*'da geçirgenliğin azalmasının yanı sıra aktif pompa sistemleri de antibiyotik direncinde etkindir (42).

En sık görülen hastane infeksiyonu etkenleri olarak önem kazanan *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlar gibi farklı substratları hücre dışına atan ve bu nedenle çoklu ilaç direncinden sorumlu olan ["Multiple Drug Resistance" (MDR)] aktif pompa sistemleri tanımlanmıştır (46). Aktif pompaların bazıları tek bileşenlidir ve substratlarını sitoplazmik zarı tutarak dışarı atmaktadırlar. Gram-negatif bakterilere özgü olan "Resistance Nodulation Division (RND)" ailesinden taşıyıcılar ise üç bileşenlidir. Bu üç bileşenli pompada, sitoplazmik zarın iç yüzünde yerleşmiş bir pompa proteini, dış membranda bir OMP (porin) ve bunlar arasında

da membran füzyon proteini (MFP) adı verilen bir periplazmik protein bulunmaktadır. MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM, *P. aeruginosa*'da bulunan, AdeABC ise *A. baumannii*'de bulunan RND ailesinden aktif pompa sistemleridir (40). RND ailesinin *E.coli* suşlarındaki üyesi AcrAB-TolC sistemidir (40). Kromozomal mutasyonlar sonucu aktif pompa sistemlerinin ekspresyonu artması bu bakterilerde birçok farklı antibiyotiğe direnç gelişmesine yol açmaktadır (47).

3.2.2. İlacın hedefi olan Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP)'lerde Oluşan Değişiklikler

Tüm PBP'ler, birçok beta-laktamazın da içinde bulunduğu "açıl serin transferazlar" ailesinin üyesidirler. Bu ailede yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler, düşük molekül ağırlıklı PBP'ler ve beta-laktamazlar bulunmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler sitoplazmik membranın dış kısmında yerleşmiştir ve peptidoglikan tabakasının çapraz bağlarından sorumludur. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler, A ve B olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Sınıf A transglikolizasyon (glikan dizilerinin uzaması) ve transpeptidasyondan (NAM'a bağlı peptid zincirler arası çapraz bağ oluşması); Sınıf B ise sadece transpeptidasyondan sorumludur. Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler ise tek işlevli DD-karboksiptidazlardır. Birçoğu DD-karboksiptidaz olarak aktivite gösterir ve peptidoglikan tabakasının çapraz bağ sayısını kontrol ederler. PBP'ler aktif bölgelerinde SXXK, (S/Y)XN ve (K/H)(T/S)G motifi içerir. SXXK motifinde bulunan serin, enzim aktivitesini sağlayan aktif nukleofildir.

Aktif bölgelerindeki moleküler benzerlikler nedeniyle PBP'ler ve beta-laktamazlar, N-asetil-muramik asit'e bağlı D-alanil-D-alanin dipeptidinin yapısal analogu olan beta-laktam molekülleri ile etkileşirler. Bu etkileşim sonucu beta-laktam halkası parçalanır ve serin ester bağlantılı açıl-enzim türevleri oluşur. Beta-laktamaz – beta-laktam molekülü etkileşiminde oluşan açıl-enzim araürününün ester bağı, su molekülleri ile hidrolize olur ve geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş olan penisilloil veya sefalosporil türevi ile aktif beta-laktamaz enzimi açığa çıkar. PBP'nin aktif bölge yapısı ise oluşan bağı su molekülü ile kolayca hidrolize olmasına izin vermez. Bunun sonucunda oluşan ara ürün beta-laktamazlara oranla çok daha yavaş deaçilasyona uğrar ve esas olarak beta-laktam ile bağlanan enzim inaktive olur (46). Beta-laktamazların beta-laktam moleküllere afinitesi ve reaksiyon hızları dirençte belirleyici olurken, PBP ile beta-laktam ajan arasındaki etkileşim ve afinite, suşun duyarlılığını belirler (40).

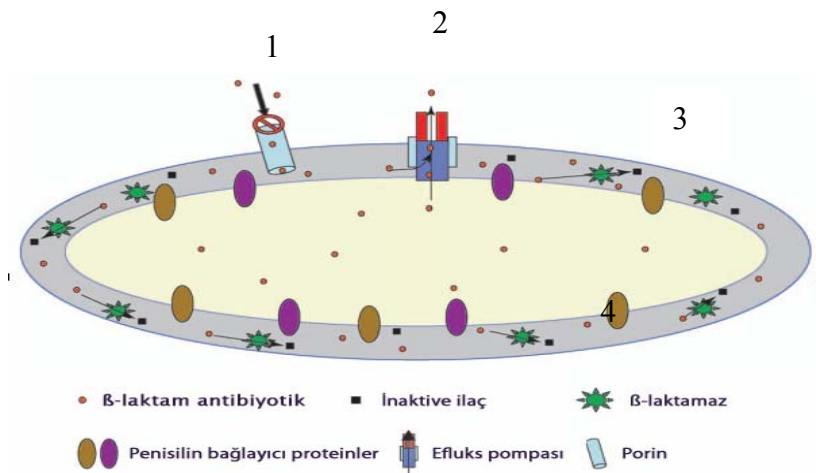
Beta-laktam antibiyotiklerin bakteri hücresindeki hedefleri PBP'lerdir. PBP'lerin inhibisyonu sonucu bakteride hücre duvar sentezi inhibe olmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşturan PBP değişiklikleri :

- i.PBP'lerin aşırı miktarda sentezi
- ii.Beta-laktamlara afinitesi düşük olan yeni bir PBP sentezlenmesi
- iii.Beta-laktamlara duyarlı bir PBP'nin, dirençli olanlarla homolog rekombinasyonu
- iv.PBP afinitesinde azalmaya yol açan nokta mutasyonları olarak özetlenebilir.

PBP değişiklikleri nedeniyle oluşan direnç Gram pozitif bakterilerde görülürken en sık görülen beta-laktam direnç mekanizmasıdır. Gram negatif bakterilerde de görülebilmekle birlikte daha nadirdir (47,48).

3.2.3. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktive Edilmesi

Beta-laktamaz enzimleriyle inaktivasyon, beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde, özellikle Gram-negatif bakterilerin en sık kullandığı mekanizmadır. Beta-laktamazlar sayıları günümüzde 500'ü aşmış olan yapısal olarak benzerlik gösteren heterojen bir enzim grubudur (24). Bu enzimler, kromozomal, plazmid, transpozon ya da integron kaynaklı olabilir. Sabit bir düzeyde üretilebildikleri gibi, indüklenebilir özellikte de olabilirler. Gram-negatif basillerde genellikle periplazmik aralıkta bulunurken, Gram-pozitiflerde dış ortama salınırlar (47).



Şekil 4: Gram negatif hücre duvar yapısında beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimine yol açan farklı mekanizmalar. 1-porin değişimleri, 2- Aktif pompa sistemleri, 3-Beta-laktamaz üretimi, 4- PBP değişimi (46 nolu kaynaktan alınmıştır).

3.3. Beta – Laktamaz yapısı ve sınıflandırılması :

Beta-laktamazlar benzer özellikleri bulunan, yapılarında alfa heliks ve beta-katlantılı tabaka bölgeleri içeren bir protein grubudur. Beta-katlantılı tabaka beş adet birbirine paralel olmayan(‘anti- paralel’) iplikten oluşmuştur. Alfa heliks yapısının amino ucunda serin yapısı bulunmaktadır. Metallobeta-laktamazlarda ise $\alpha\beta\beta\alpha$ katlantısı bulunur ve katalizden sorumludur. Beta-laktamazları sınıflandırmak için günümüzde iki klasifikasyon kullanılmaktadır. Bunlar moleküler yapıya göre olan Ambler sınıflaması ve Bush-Jacoby-Medeiros’un işlevsel sınıflamasıdır. klasifikasyonudur. Ambler sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar aminoasit sekanslarının benzerliklerine göre A,B, C ve D olarak dört gruba ayrılır. A, C ve D beta-laktamazlar, serin beta-laktamazlar grubuna girerken, B grubu metallo-beta laktamazları içerir. Bu enzimlerin aktivitesi için çinko gereklidir. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflaması ise yapı yanısıra substrat ve inhibitör profillerini de içeren işlevsel bir sınıflamadır. Bu sınıflama sisteminde 4 ana grup ve çok sayıda alt grup bulunmaktadır (49).

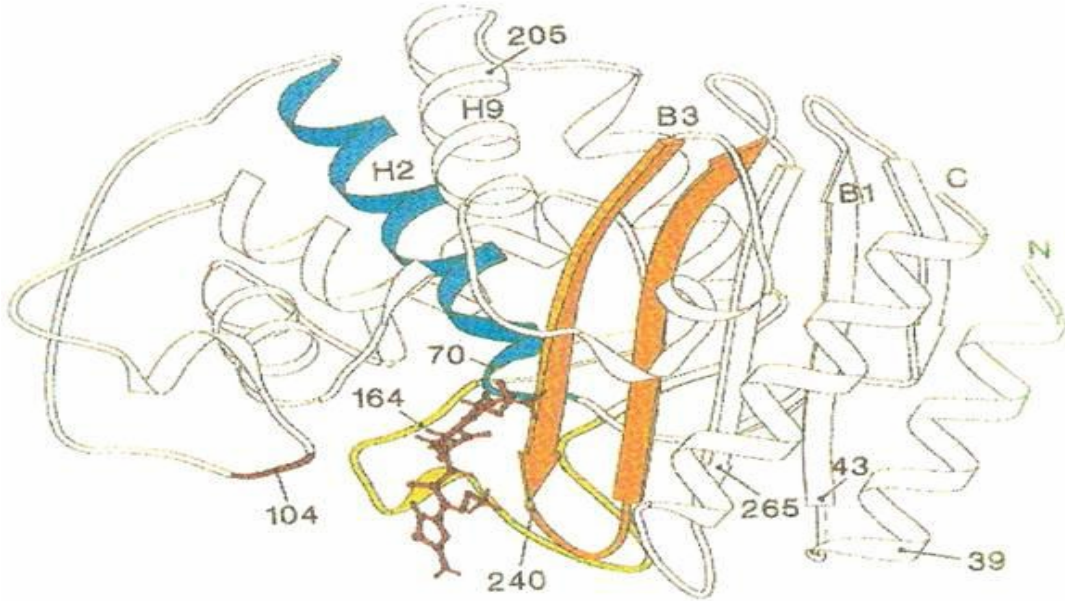
Tablo 1: Beta-laktamazların sınıflandırılması

Fonksiyonel Grup*	Moleküler Sınıf**	Öncelikli Substrat	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Kromozomal ve plazmid kökenli AmpC tipi enzimler (CMY-3b,Smr,FOX-1-5,LAT-1-4 vb)
2a	A	Penisilinler	Gram(+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Dar spektrumlu Sefalosporinler	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler,sefamisinler hariç sefalosporinler,monobaktamlar	TEM ve SHV türevi GSBL’ler,(TEM-1-160,SHV-1-100) PER-1-2,VEB-1-3,CTX-M-1-54, GES-1-9
2br	A	Penisilinler	IRT 1-28,SHV-10 ve 26,TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	PSE-1, PSE-3-4,SAR-1
2d	D	Oksasilin, Penisilinler	OXA tipi enzimler (OXA-1-82)
2e	A	Sefalosporinler	<i>Proteus vulgaris</i> ’in indüklenebilir beta laktamazı
2f	A	Penisilinler,Sefalosporinler, Karbapenemler,monobaktamlar	<i>E. cloacae</i> ’nin NMC-A ve IMI-1’i ve <i>S. marcescens</i> ’in Sme-1-2 enzimleri
3	B	Karbapenemler dahil birçok beta laktam (monobaktamlar hariç)	Değişik türlerce üretilen IMP-1-23, VIM-1-14
4	?	Penisilinler	<i>Burkholderia cepacia</i> ’nın penisilinazı

*Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre **Ambler sınıflandırmasına göre

3.3.1. A Sınıfı Beta- Laktamazlar

Bu sınıfa ait enzimlerin katalitik özelliklerine ait bilgiler dizi analizlerinin yapılması ve yapısal özelliklerin ortaya çıkartılması ile gelişmiştir. Sınıf A beta-laktamazlar; aktif bölgelerinde 3 adet ortak motife sahiptir. Bunlar; $S_{70}-X_{aa}-X_{aa}-K_{37}$ (SXXXK motifi), $S_{130}-D_{131}-N_{132}$ (SDN ilmiği) ve $K/R_{234}-T/S_{235}-G_{236}$ (KTG) motifleridir. Bu motifler, beta-laktam ajanların bağlanması ve hidroliz edilmesi için gerekli olan yapılardır. Substrat bağlayıcı cepte Serin 70 ve Alanin 237 amino asitlerinin NH grupları tarafından oluşturulan oksianyon deliği beta-laktamazların hidrolizinin gerçekleştiği bölgedir. 160-179 arası amino asitlerden oluşan omega halkası bu sınıfa özgüdür. Bu halkada yer alan korunmuş Glu166 amino asidi kataliz işleminde yer alır. Arg 164 ve Asn 179 omega halkasının sınırlarını belirler (40). Beta-laktam aktivitesi sırasında S70 beta-laktam halkası ile ester bağı oluşturan nukleofilik gruptur. Üç boyutlu yapıda korunmuş motiflere çok yakın bulunan su molekülü ise bu ester bağına hidrolize eder ve inaktif penisilloil veya sefalosporil molekülünün ayrılmasını sağlar.



Şekil 5 : Sınıf A TEM beta-laktamazın tersiyer yapısı. Ser 70 yakınında sefotaksim modellendirilmiştir. Burada alfa heliks yapısı mavi ile 104. pozisyonundaki halka ise kahverengi olarak gösterilmiştir. 162-179. pozisyonlar arası omega halkası ise sarı renktedir (50 nolu kaynaktan alınmıştır).

Sınıf A beta-laktamazlar grubunda yer alan sıkça bulunan ve *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde sık olarak bulunan ortaya çıkan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları esas olarak penisilinaz aktivitesinde olup 1.kuşak sefalosporinlere karşı etkileri daha azdır. Bu iki beta-laktamaz enzim grubu (TEM ve SHV), son 10 yıllık süreçte genişlemiş spektrumu beta laktamazların öncülleri oldukları için dikkati çekmiştir. GSBL'ler aktif bölgelerini ilgilendiren birkaç aminoasit mutasyonu sonucu substrat profilini değiştirmiş ya da genişletmiş enzimlerdir. GSBL'ler, penisilinleri, sefamisinler hariç tüm (1-4. kuşak) sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize etmektedir.

TEM ve SHV enzim ailelerinde aktif cepte yer alan beş amino asit molekülü GSBL fenotipi açısından önem taşımaktadır. Bunlar β - katlantılı tabakanın b3 ipliğinde yer alan Gly 238 ve Ala 237, omega halkasının boyun kısmında yer alan Arg 164 ve Asp 179; aktif bölgede yer alan Asp 104'tür. Özellikle 238. pozisyonundaki glisinin yerine serin geçmesi TEM ve SHV grubu GSBL'lerde en sık rastlanan mutasyondur (24).

3.3.1.1. İnhibitör – dirençli beta-laktamazlar:

Gerek TEM-1,2 ve SHV-1, gerekse bunların genişlemiş spektrumlu varyantları klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidir. Ancak ilk kez 1997'de İskoçya ve Fransa'da tarif edilen enzimler inhibitörlere dirençlidir. Bu enzimlerin çoğu TEM varyantı olduğu için 'Inhibitor Resistant TEM' (IRT) olarak adlandırılır.

İnhibitör – dirençli beta-laktamazların sıklığının beklenenden daha az olmasına sebep olarak ABD'deki bir çok laboratuvar tarafından identifiye edilmemesi gösterilmektedir. İnhibitör – dirençli TEM beta-laktamaz üreten bazı *E.coli* suşlarında halen piperasilin – tazobaktamın etkin olduğu görülmüştür (51).

3.3.1.2. TEM ve SHV dışı grup A enzimler:

Literatürde TEM veya SHV grubundan olmayan çok sayıda sınıf A beta-laktamaz tariflenmektedir. Bunlardan en önemlileri CTX-M ve PER (PER-1 ve PER-2) aileleridir. Günümüzde 50'den fazla CTX-M tipi beta-laktamaz enzimi bildirilmiştir (24). Bu beta-laktamazlar *E.coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Citrobacter spp.* ve *Enterobacter spp.*'de bulunmuştur (17,52-54). İlk CTX-M (MEN-1) tipi 10 yıl önce tanımlanmıştır (31). *Kluyvera ascorbata* 'nın plazmidle taşınan bu enzim grubunun rezervuarı olduğu düşünülmektedir (12,55-59). Bu enzimler beş küme(CTX-M-1,2,8,9,25) altında

toplanabilir. Birçok TEM ve SHV kökenli GSBL grubu enzimlerin aksine CTX-M grubu enzimler sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidime göre çok daha fazla parçalar. Bu grup tazobaktamla klavulanik asitle olduğundan daha fazla inhibe olur.

PER-1 enzimi ilk kez ülkemizde izole edilmiş suşlarda bildirilmiş (26) ve uzun yıllar boyunca bildiri ülkemize özgü olarak bilinmiş genişlemiş spektrumlu bir enzimdir (60). Bu enzim, ilk defa *P.aeruginosa*'da ve daha sonra da *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında saptanmıştır (26). PER enzimi TEM ve SHV grubu GSBL enzimlerle % 25 – 27 oranında homoloji gösterir. PER – 1 enzimi de diğer sınıf A GSBL 'ler gibi penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eder ve klavulanik asit ile inhibe olur. PER-1 enzimi ile %86 oranında homoloji gösteren PER-2 enzimi ise *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis* ve *V.cholerae* O1 El Tor izolatlarında saptanmıştır ve en sık Güney Amerika'dan bildirilmiştir (27).

A sınıf beta-laktamaz enzimler içerisinde yer alan diğer GSBL'ler arasında VEB-1-3, GES-1-9, BES-1, IBI-1 ve IBI-2 sayılabilir. VEB–1 integronlar ile ilişkili bulunan ilk sınıf A grubu GSBL'dir. İntegronlarla ilişkili diğer enzimler IBC-1, bazı PSE, OXA ve CARB beta-laktamazlardır.

3.3.1.3. Karbapenemleri hidrolize eden Sınıf A beta-laktamazlar :

Karbapenemler sınıf A beta-laktamazlara karşı oldukça dirençlidir, ancak bu gruptaki bazı enzimler (Sme-1, Sme-2, NMC-A, IMI-1 ve KPC-1-2) karbapenemleri de hidrolize edebilmektedir (61). Bu enzimler nadir olarak bulunmaktadır ancak karbapenemlerin yoğun olarak kullanıldıkları yerlerde artmaya başladıkları görülmüştür (62, 63).

3.3.2. B Sınıfı Beta- Laktamazlar

Sınıf B beta-laktamazlar metalloenzimlerdir ve serin beta-laktamazlardan (Sınıf A, C, D) farklı olarak aktif bölgelerinde metal bağımlı (Zn^{+2}) bağımlı bir tiyol (SH-) grubu bulunur. Bu enzimler klasik beta-laktamaz inhibitörlerine dirençliyken, şelatör ajanlarla (ör. EDTA) inhibe olurlar. Birkaç ayrıcalık dışında bu grup enzimler sefamisin ve karbapenemler de dahil olmak üzere birçok beta-laktam ajana dirence yol açar. Monobaktamalara karşı aktiviteleri kısıtlıdır (40, 64). Sınıf B grubu beta-laktamazlar üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar B1, B2 ve B3 olarak adlandırılır.

B1 alt grubu içerisinde *Bacillus cereus*'un ürettiği metallobeta-laktamaz II (BcII), *Bacteriodes fragilis*'in ürettiği CcrA, *Chryseobacter meningosepticum*'un BlaB, *C. indologenes* 'in IND-1, beta-laktamazları ile, bazı *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *S. marsescens*, *K.pneumoniae* suşlarının ürettiği IMP tipi beta-laktamazlar ve bir kısım *P.aeruginosa* izolatlarının ürettiği VIM grubu beta-laktamazlar yer almaktadır. Bu enzimlerin son ikisi plazmidle taşınmaktadır. B1 alt grubu metallobeta-laktamazlar çinko bağlayan motifte birinci pozisyonda histidin yerine asparajin içerir (64). Alt grup B2 'de ise *Aeromonas spp.* tarafından üretilen CphA, ImiS ve CphA2 gibi beta-laktamazlar ve *Serratia fonticola*'nın ürettiği Sth-1 beta-laktamaz yer alır. B3 alt grubunda ise *S.maltophilia*'nın ürettiği L1, *C.meningosepticum*'un GOB beta-laktamazı, *Legionella gormanii*'nin FEZ-1 ve *Janthinobacterium lividum*'nun ürettiği THIN – B beta laktamazları bulunmaktadır (64).

B grubu beta-laktamazların, (*B.cereus* 569/H/9'dan Bc-II, *B.fragilis*'ten CcrA, *S.maltophilia*'dan L1, *P.aeruginosa*'dan IMP-1) atomik yapıları çözümlenebilmiştir. Bu beta-laktamazları kodlayan genlerin primer yapıları farklılık gösterse de tüm metallo-beta laktamazların üç boyutlu yapıları birbirine benzemektedir. Bc-II ve CcRA'nın primer yapılarında aktif bölgede iki çinko iyonu bulunmaktadır. Buna karşın, *A.hydrophilia* 'nın CphA enziminde aynı bölgede tek çinko iyonu yer alır. *S.maltophilia*'nın L1 enzimi ise tetramer olarak bulunur ve her bir alt ünitesine iki çinko iyonu bağlanır.

Metal iyonu nedeniyle metallo beta-laktamazların katalitik yolu sınıf A ve C beta-laktamazların aksine açıl enzim ara ürününü içermez. Sınıf B beta-laktamazlar, aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı bir thiol grubu bulunan beta-laktamazlardır (65,66). Hepsinde hidroliz H_2O molekülü ile olur. Su molekülü metal iyonuna yakınlıktan ötürü artmış nukleofiliteye sahiptir. Su ile tepkime sırasında beta-laktam yapısının karbon grubuna hidroksit eklenmesi ile geçici bir nonkovalan ara ürün oluşur.

Metalloenzimlerin bazıları kromozomal genlerce kodlanır, bazıları ise plazmid ve integronlarla taşınır. Metallo-beta laktamazların kromozomal olarak kodlananları arasında *B.cereus* (BII), *B.anthraxis*, *S.maltophilia* (L1), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *C.meningosepticum* (BlaB ya da GOB-1), *C. indologenes* (IND-1), *Leigonella gormanii*(FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mb11B), *Myroides spp.* (MUS-1, TUS-1), *Janthinobacterium lividum* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) sayılabilir (64). *B.cereus*, *S. maltophilia*, *A.hydropholia* ve *Aeromonas*

jandaei'nin metallo β -laktamazları indüklenebilir (40). IMP ve VIM tipi enzimler integronlarca taşınırken SPM-1 ise plazmidlerle aktarılır (66).

3.3.3. C Sınıfı Beta-Laktamazlar:

Ambler C sınıfı beta-laktamazlar (Bush-Jacoby-Medeiros Grup1 beta-laktamazlar) *Salmonella spp.* ve *K. pneumoniae* hariç tüm Gram negatif basiller tarafından üretilmektedir (40). Bu enzimlerin kromozomal olanları özellikle *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* klinik izolatlarında önemlidir. C sınıfı beta-laktamazlar, sefalosporinleri (geniş spektrumlu sefalosporinler dahil) penisilinlerden daha fazla hidrolize ederler. Bu beta-laktamazlar, A sınıfı beta-laktamazlara kıyasla bu grup daha büyük bir aktif bölgeye sahiptir. Böylelikle geniş spektrumlu sefalosporinleri daha iyi bağlayabilirler. Sınıf C beta-laktamazlar, A sınıfının aksine klavulanik asit ile inhibe olmaz. Buna karşın sınıf A beta-laktamazlara benzer yapısal özellikler taşırlar. Sınıf C enzimlerin yapısal özelliklerine bakıldığında, sınıf A enzimlerde olduğu gibi enzim aktif bölgesindeki serin (S) aminoasidini uzun bir alfa heliksin ikinci kıvrımında bir lizin (K) aminoasidinin izlediği görülmektedir (S-X-X-K motifi). Bunun dışında enzim aktif bölgesinde bir S-X-N (serin-X-asparajin) veya Y-X-N (Tirozin-X-asparajin) kutusu ile sınıf A enzimlerindeki KTG motifine karşılık gelen lizin/arjinin/histidin-treonin/serin-glutamin (K/N/H/T/S-G) motifi bulunmaktadır (40,67).

Normal şartlar altında; kromozomal AmpC grubu (C sınıfı) beta-laktamaz üreten Gram negatif basillerde beta-laktamaz üretimi baskılanmıştır; yani sürekli değildir. Baskılamanın kalkması ve ekspresyonun başlaması hücre duvar yıkımı ile ilgilidir. Bu mekanizmalar en çok *Enterobacter spp.* türlerinde çalışılmıştır (67). Amp R molekülü normal durumda hücre duvar sentezinde yer alacak olan UDP N-asetil muramik asit-pentapeptid ile etkileşime girerek baskılayıcı (represor) olarak hareket eder. Bu formda Amp R, Amp C ekspresyonunu engeller. Hücre duvar yıkım ürünü olan anhidro- N-asetil muramik asit -tripeptid varlığında ise Amp R, inhibisyonu gerçekleştiremez, AmpC ekspresyonu başlar. Hücre içinde bulunan AmpD (muropeptidaz) ise, anhidro-MurNac peptidleri parçalar. Tekrar hücre duvar sentez yapımına girmelerini sağlar. Dolayısıyla AmpC ekspresyonundaki artış, beta-laktam grubu antibiyotiklerin aktivitesi ile peptidoglikan tabakasından önemli miktarlarda anhidro-MurNac-peptid açığa çıkmasına bağlıdır. Muropeptidazların kapasitesi aşıldığında anhidro MurNac-peptid Amp R'ye bağlanabilir ve AmpC represyonu kalkar. Sonuç olarak, yüksek oranda

beta-laktamaz üretimi ortamda antibiyotik bulunması ile meydana gelir. Ancak AmpD bulunmayan mutantlarda sürekli yüksek düzey AmpC ekspresyonu söz konusudur. Bunlar ‘dereprese mutant’ olarak adlandırılırlar. Kromozomal AmpC yapımı klinik olarak önemli olan türlerde bu dereprese mutantlar 3. kuşak sefalosporinler, üreidopenisilinler veya karboksipenisilinlere tedavi sırasında seçilir ve sorun oluşturlar (67).

1989 yılında ilk plazmid kökenli AmpC enzimi tanımlanmıştır (40,67). Bu beta-laktamazlar özellikle kromozomal beta-laktamaz üretmeyen veya kromozomal beta-laktamazları klinik açıdan önem taşımayan türlerde, örneğin *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *Salmonella enterica* serotiplerinde görülmektedir (67). Bu enzimler sürekli olarak yüksek düzeyde salınırlar. Bu nedenle, son yıllarda tanımlanan DHA-1,2 ve ACT-1,2 olduğunda indüklenebilir özellik görülmez (67). Plazmid kökenli aktarılabılır AmpC tipi beta-laktamazlar, kromozomal AmpC beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile gelişmiştir (67). Plazmid kökenli AmpC beta-laktamazları kökenlerine göre gruplandırılabilirler:

1. *C. freundii*’nin kromozomal AmpC geninden köken alan çoğu CMY ve LAT grubu enzimler;
2. *E.cloacae*’den köken almış, ACT-1 ve MIR-1 enzimleri;
3. *M.morganii* kromozomal enzimleri ile aynı nukleotid dizisini taşıyan DHA-1 ve DHA-2 ;
4. *H.alvei* kökenli ACC-1;
5. *Aeromonas sobria* kökenli FOX enzimleri;
6. Aeromonadaceae kromozomal beta-laktamazlarından köken aldığı düşünülen CMY-1, CMY-8, CMY-9, MOX-1 ve MOX-2 (40, 67).

Normalde kromozomal beta-laktamazı olmayan türlerde, ‘dereprese’ mutantlarda görülen bir antibiyogram fenotipi (sefoksitine, beta-laktamaz inhibitörlerine ve 3. kuşak sefalosporinlere direnç), bu tip beta-laktamazlar için uyarıcı olmalıdır.

3.3.4. D Sınıfı Beta-Laktamazlar:

Bu grupta *Enterobacteriaceae* üyesi ve *P.aeruginosa*’da sık olarak bulunan OXA (Oksasilin hidrolize eden) tipi beta-laktamazlar yer almaktadır (30). OXA enzimleri penisilin,

kloksasilin, oksasilin ve metisilini hidrolize etme özelliğindedir. Bu grup beta-laktamazlar klavulanik asitle zayıf; NaCl ile güçlü bir şekilde inhibe olmaktadır. D sınıfı beta-laktamazlar, A ya da C sınıfı beta-laktamazlarla %16 oranında amino asit benzerliği göstermektedir. Plazmid ya da integronlarla taşınmaları yayılımını kolaylaştırmaktadır.

A ve D grubu beta-laktamazların primer ve sekonder aminoasit dizilimleri farklı olsa da, üç boyutlu yapıları benzerdir.

Bazı OXA tipi enzimler (OXA-15, OXA-10-11, OXA-14-16-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35) GSBL karakterindedir (24). Daha çok *A.baumannii* suşlarında rastlanan bazı D sınıfı beta-laktamazlar da karbapenemaz niteliğindedir. Aminoasit dizilerinin benzerliğine göre 3 alt gruba ayrılan bu enzimlerin; aralarında Türkiye'nin de bulunduğu çeşitli Avrupa ülkelerinden, Singapur, Çin gibi uzakdoğu ülkelerinden, Arjantin ve Güney Afrika gibi birbirinden çok farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş suşlarda saptanmaları, önemlerini arttırmaktadır (29).

3.4. Antibiyotik Direnç Genlerinin Yayılım Yolları

Antimikrobiyal ajanların birçoğu doğada bulunan Actinomycetales sınıfı bakteriler veya funguslarca üretilmektedir. Bu nedenle de antimikrobiyal maddeleri üreten bakterileri koruyacak olan direnç genleri de doğada bulunmaktadır. Bu direnç genlerinin duyarlı türlere aktarımının üç temel mekanizma ile meydana geldiği düşünülmektedir (40):

3.4.1. Transformasyon:

Bazı bakteri türleri, ortamda bulunan çıplak DNA moleküllerini uygun koşullar altında, hücre içine alabilme yeteneğine sahiptir. Bu genler homolog rekombinasyonla kromozoma entegre olur. Örneğin *Streptococcus pneumoniae*, mozaik PBP genlerini bu yolla kazanır.

3.4.2. Transdüksiyon:

Bakteriyofajların, bakteri hücresi içinde oluşumları esnasında, kapsit proteinlerinin içine, kendi genomlarının bitişiğindeki bazı kromozomal parçaları veya kendi genomları ile yaklaşık aynı büyüklükteki (genellikle 40 kb civarı) ilgisiz bir plazmid ya da kromozom parçasını paketlemeleri ve başka bakterileri infekte ederken bu genleri de nakletmeleridir.

3.4.3. Plazmidler

Plazmidler, kendi kendini eşleyebilen, küçük kromozom dışı genetik elementleridir. Birçok plazmid sirküler yapıdadır. Büyüklükleri 1500-400.000 baz çifti arasında değişir. Büyük plazmidler (20-120 kb) direnç ile ilgili genetik bilgiyi kodlayabilir. Bakteri hücresinin temel metabolik işlevleri için gereken genetik bilgiler kromozom üzerinde olduğundan, genellikle plazmidlerin kaybedilmesi veya kazanılması, hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını etkilemez. Plazmid üzerinde çoğunlukla antibiyotik direnç genleri, virulans genleri ve plazmidin kendi varlığını sürdürebilmesi ve transferi için gerekli proteinler kodlanır (68).

Plazmidler, kendilerini diğer mikroorganizmalara aktarabilme yeteneklerine göre de sınıflandırılabilirler. Plazmidin bir bakteri hücresinden diğerine transferine konjugasyon adı verilir. Eğer konjugatif plazmid Gram-negatif bir bakteride ise, hücrenin dışında “pilus” adı verilen protein yapısında bir kanal oluşturur ve diğer proteinlerin de yardımıyla kendi aktarımını sağlar. Konjugatif plazmidlerin Gram-pozitif bakteriler arasında transferi için ise, iki hücrenin doğrudan teması gereklidir. Plazmidler, transdüksiyon ve transformasyon mekanizmaları ile de bir bakteriden diğerine geçebilir (68).

3.4.4. Transpozonlar

Transpozonlar, kendi kendini eşleyemeyen, ancak, kendini eşleyebilen bir genetik elemandan diğerine geçebilen DNA segmentleridir. Transpozonlar, plazmidten plazmide, plazmidten bakteriyofaja, plazmidten kromozoma veya tam tersi yönde geçiş yapabilir bunun için yapılarında bulunan “transpozaz” adlı enzimden yararlanırlar (40,69). Bu özellikleri nedeniyle, bakteri DNA’sında delesyon, inversiyon ve duplikasyon gibi olaylara yol açabilirler. Beta-laktamaz genleri de dahil olmak üzere, birçok antimikrobiyal direnç geninin transpozonlarla ilişkisi gösterilmiştir.

Gram-pozitif bakterilerde bulunan bazı transpozonlar, kendilerinin bir kromozomdan diğerine geçişini sağlayabilirler, yani konjugatif özellikte olabilirler (40). Transpozon benzeri, ancak herhangi bir direnç geni içermeyen “insersiyon sekansları” (IS elemanları) da genetik yapıda çeşitli değişikliklere neden olabilirler. Örneğin, güçlü bir öncülü (promoter) antibiyotik direnç genlerinin önüne yerleştirip, bu genlerin ekspresyonunu arttırabilirler.

3.4.5. İntegronlar

İntegronlar, diziye özgül (site specific) integras ve direnç genlerini içeren yapılardır. Integras enzimi sayesinde direnç gen kasetleri hedef diziye integre olur. Hedef bölgeye integre olur. İntegronlar genellikle transpozonlarda bulunur.

İntegronlar; dizgiye özgü rekombinasyon sisteminin genetik determinantlarına sahip olup gen kasetlerini tanıır ve onları yakalar. İntegron yapısında 5' korunmuş bölgede; integras geni (*intI*), gen kasetlerinin bulunduğu rekombinasyon bölgesi (*attI*) ve promoter bölgesi (P_c veya P_{ant}) yer alır. Farklı gen kasetlerinin ekspresyonu promoter bölgesinin kontrolündedir ve bu yüzden integronlar "doğal ekspresyon vektörleri" olarak da adlandırılırlar. İntegronlarda gen ekspresyonu; promoter'ın gücüne, genin kopya sayısına, gen kasetinin promoter'a uzaklığına ve ek promoter bölgelerin varlığına bağlıdır. İntegronların, 3' korunmuş bölgesinde, *qacE-1* ve *sulI* geni bulunmaktadır. İki korunmuş bölge arasında ise "59-baz elemanı" veya *attC* adı verilen özel rekombinasyon bölgeleri bulunur. Bu dizginin yapısı ait olduğu gene göre farklılık gösterir. 59-baz elemanlarının iki ucunda, birbirinin ters komplementeri olan, yedi bazlık iki "kor" bölgesi bulunur (GTTRRRY ve RYYYAAC, R:pürin,Y:pirimidin) . Integras genleri, bu rekombinasyon bölgesini tanıyıp, gen kasetlerini integronun yapısına katarlar .

İntegronlar çok yaygın genetik elemanlar olup kendi başlarına mobil değildir. Ancak gen kasetlerini ve özellikle de antibiyotik direnç genini içeren gen kasetlerini yapısına integre edebilmeleri nedeniyle antimikrobial direnç yayılımında önemli rol oynamaktadır (70,71).

Transpozon ve integronlar bakterilerin mutasyonların dışında da değişiklikleri birbirine aktarmalarını sağlar. Bu yapılar sıklıkla plazmid üzerinde taşınabildiği gibi ayrıca kromozomal lokalizasyona sahip olabilir (72).

Beta-laktamaz genleri yukarıda sözü edilen mekanizmalar aracılığıyla bir mikroorganizmadan diğerine geçebilirler. Beta-laktamaz genleri, bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanların üzerinde yer alabilir.

3.5. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazların Epidemiyolojisi:

1983 yılında ilk bildirimlerinden beri GSBL üreten bakteriler tüm dünyada önem kazanmış ve önemini sürdürmektedir (1).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar birçok Gram-negatif bakteri türü tarafından yapılmaktadır. Bunlar arasında Enterobacteriaceae üyeleri özellikle de *E.coli* ve

K.pneumoniae ilk sırada gelmektedir. *Enterobacteriaceae* üyesi olmayan türlerde GSBL üretimi daha nadir görülmekle birlikte prevalans açısından en önemli bakteri *P.aeruginosa*'dır. (44). GSBL prevalansı ülkelere, şehirlere, hastanelere hatta aynı hastane içerisindeki servislere göre değişebilmektedir. Aşağıdaki bölümde GSBL epidemiyolojisi yer almaktadır.

3.5.1. Avrupa :

GSBL üreten ilk suş 1983'te Avrupa'da saptanmıştır (1). Bu ve bunu izleyen ilk bildirimler Almanya ve İngiltere'den olmakla beraber GSBL'nin ortaya çıkarılmasından sonraki on yıllık dönemde bildirimlerin çoğu rapor Fransa'dandır (6,73). Fransa'daki ilk büyük salgın 1986 yılında üç yoğun bakım ünitesinde 54 hastanın infekte olması bunun diğer ünitelere de bulaşması ile meydana gelmiştir. 1990'ların başında Fransa'da hastane kökenli *K.pneumoniae* suşlarının % 25-35'i GSBL üretirken son dönemde infeksiyon kontrol yöntemlerinin gelişmesiyle bu oran azalmıştır (7,74). Kuzey Fransa'da GSBL pozitif *K.pneumoniae* izolatlarının oranı 1996 yılında %19.7 iken 2000 yılında bu oran %7.9 'a inmiştir (7). Öte yandan aynı yıl GSBL üreten *E.aerogenes* oranı %30.2 olarak bildirilmiştir (6).

Batı Avrupa ülkelerinde oranlar düşerken Doğu Avrupa'da GSBL prevalansında artış izlenmektedir (75).

GSBL üretim oranları açısından Avrupa ülkelerinde değişik coğrafi bölgelerinde ülkeden ülkeye hatta hastaneler arasında bile farklılık gözlenmektedir. 1997-1998 yılları arasında Batı ve Güney Avrupa'da 24 yoğun bakım ünitesinden toplanan 433 izolatta yapılan bir çalışmada *Klebsiella spp.*'de % 25 oranında GSBL saptanmıştır (6,76). Araştırmacılar 1994 yılında benzer bir surveyans çalışması yaptıklarını ve genel olarak bu iki dönem arasında GSBL üreten *Klebsiella spp.* oranlarında belirgin fark gözlemlenmemiş olmasına rağmen GSBL üreten *Klebsiella spp.* bildiren yoğun bakım sayısının arttığını bildirmektedir (76,77). Avrupa'da 100 farklı yoğun bakım biriminde yapılan bir başka surveyans çalışmasında da GSBL üreten *Klebsiella spp.* oranı İsveç'te %3 iken Portekiz'de %34 'ü bulmuştur (6).

3.5.2. Kuzey Amerika:

Amerika Birleşik Devletlerin'de ilk GSBL üretimine ilişkin bildirimler 1988 yılında başlamıştır (78). 1989 yılında Quinn ve arkadaşları Chicago'da TEM-10 üreten bir *K.pneumoniae* izolatının etken olduğu bir salgın bildirmiştir (79). Bunu izleyen yıllarda gerek ABD gerekse Kanada'da SHV tipi GSBL enzimi üreten ve/veya CTX-M enzimi üreten

bakterilerle oluşan salgınlar gözlenmiştir (80,81). 2000 öncesi yıllarda yapılan surveyans çalışmalarında, GSBL saptanması açısından MİK değerlerinin 32µg/ml olarak alınması; duyarlılıkta azalmaya bakılmaması GSBL prevalansının yanlış olarak daha düşük bildirilmesine neden olmuştur (6,82).

Kuzey Amerika'da 2001 yılında yoğun bakımlardan izole edilen 36000 suşta yapılan surveyans çalışmasında üçüncü kuşak sefalosporin direnci *K.pneumoniae* 'da %13 olarak bulunmuştur (83). 1994-2000 arası dönemde ise duyarlı suşlarda %3 oranında azalma olmuştur (83). ABD Ulusal Hastane Kaynaklı Surveyans (NNIS) verilerine göre Ocak 1998-Haziran 2002 arasında 110 tane yoğun bakım biriminden izole edilen 6101 *K.pneumoniae* suşunda üçüncü kuşak sefalosporin direnç oranı %6.1'dir (84). Aynı yoğun bakım birimlerinin %10'nunda geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç oranının %25'i aştığı belirlenmiştir (84). Buna karşın yoğun bakım dışındaki birimlerden üretilen 10733 *K.pneumoniae* suşunun 3. kuşak sefalosporin direnç oranlarının ise %5.7 olduğu saptanmıştır. Poliklinik hastalarından izole edilen 12059 adet *K.pneumoniae* suşunda ve 71448 adet *E.coli* suşunda %0.4 oranında seftazidim direnci sırası ile % 1.8 ve % 0.4 olarak bulunmuştur (84).

3.5.3. Güney ve Orta Amerika

1988 ve 1989 yıllarında Şili ve Arjantin'de SHV-2 ve SHV-5 taşıyan *K.pneumoniae* suşları bildirilmiştir (6,85). 1989'da ise Arjantin'de çoklu dirençli bir *S.enterica* serovar Typhimurium suşuna bağlı salgın meydana gelmiştir. Bu suşun CTX-M-2 ürettiği saptanmıştır. Suş ve salgın Güney Amerika'nın birçok bölgesine yayılmıştır (86). Brezilya'dan da diğer CTX-M grubu enzim (CTX-M-8,-9 ve -16) üreten izolatlarla ilgili çeşitli olgular bildirilmiştir (32,87). İlginç olarak Güney ve Orta Amerika bölgesinde TEM grubu GSBL bildiren yayın sayısı azdır. Benzer şekilde GES-1 beta-laktamazı Fransız Guyanası'nda yenidoğan bir bebekten izole edilen *K.pneumoniae* suşunda belirlenmiştir (88). BES-1 ise ilk kez Rio de Janeiro'da bir *S. marcescens* izolatında saptanmıştır (33).

3.5.4. Afrika ve Orta Doğu ülkeleri

Güney Afrika'da GSBL üreten *Klebsiella spp.* suşlarının yaptığı salgınlar bildirilmiştir (89,90). Ancak ulusal surveyans verileri bulunmamaktadır. Öte yandan 1998-1999 yıllar arasında tek bir Güney Afrika hastanesinde izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının % 36.1 oranında GSBL ürettiği saptanmıştır (91). TEM tipi GSBL'ler İsrail, Suudi Arabistan ve Kuzey Afrika ülkelerinden de bildirilmiştir. Nijerya ve Kenya'dan üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli; ancak GSBL ürettiği gösterilmemiş *Klebsiella* infeksiyonları ile

oluşan salgınlar bildirilmiştir. 2001 yılında Kenya’da TEM ve SHV dışı GSBL’lerden CTX-M (CTX-M-12) de gösterilmiştir. Güney Afrika’da GES-2 üreten bir *P.aeruginosa* suşu bildirilmiştir (6).

3.5.5. Avusturalya

Bu bölgede GSBL’ler ilk kez 1986-1988 yılları arasında toplanan gentamisine dirençli *Klebsiella spp.* izolatlarında saptanmıştır (92). Bu çalışmadaki GSBL’nin bir SHV türevi olduğu gösterilmiştir. Bunu izleyen yıllarda ülkenin birçok yerinde GSBL üreten bakterilerle oluşan salgınlar meydana gelmiş; bu salgınlardan hem erişkin hem de pediatrik hastalar etkilenmiştir (91). Genel olarak Avusturalya’daki hastanelerde GSBL üreten *K.pneumoniae* oranı %5’tir (91).

3.5.6. Asya

1988 yılında ilk olarak Çin’de SHV-2 üreten *K.pneumoniae* izolatları bildirilmiştir (78). 1998-1999 yılları arasında toplanmış 2193 *K.pneumoniae* izolatında GSBL üreten suşların oranı %30.7 iken; *E.coli* suşlarındaki oran %24.5 olarak bildirilmiştir (91). Bir eğitim hastanesinde 1997-1999 arasında toplanan ve kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarında GSBL oranı %27 olarak bildirilmiştir (93). Kore, Japonya ve Malezya’da yapılan ulusal surveyans çalışmalarında GSBL pozitif *E.coli* oranının %5-8; Tayland, Tayvan, Filipinler ve Endonezya’da ise %12-24 arasında bulunduğu bildirilmektedir. (94). Japonya’da GSBL üreten *K.pneumoniae* oranı %5 iken ; Asya’nın diğer bölgelerinde %20-50 arasında değişmektedir (94,95).

3.6. CTX-M Grubu Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar

Plazmid kökenli CTX-M grubu beta-laktamazların bugün için 50’den fazla varyantı (11) bulunmaktadır. Bu varyantların dağılımı coğrafi bölgelere göre değişim göstermektedir. CTX-M tipi enzimler tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. CTX-M tipi beta-laktamazlar ; CTX-M-1’den CTX-M-64 ‘e kadar farklı tiplerdedir. Toho1 (CTX-M-44) ve Toho2 (CTX-M-45) , UOE-1(CTX-M-15) enzimleri de bu grubun üyeleridir. CTX-M tipi enzimlerin pI noktası >8.0’dır. Moleküler yapı olarak grup A beta-laktamazların bir üyesidir (11). *Kluyvera ascorbata*’nın plazmidle taşınan CTX-M enzim grubunun rezervuarı olduğu düşünülmektedir (12,55-57).

CTX-M tipi beta-laktamazlar ilk kez, 1986 yılında Matsumoto ve arkadaşları (96) beta-laktam antibiyotiklerin farmakokinetik çalışmaları esnasında bir laboratuvar deney hayvanının

fekal florasında sefotaksime dirençli *E.coli* suşundan FEC-1 adını verdikleri TEM veya SHV olmayan bir beta-laktamaz saptamaları ile ortaya çıkmıştır. 1989 yılında ise Bauerfeind ve arkadaşları da (97) sefotaksime dirençli bir *E.coli* izolatında TEM veya SHV dışı, sefotaksime gösterdiği hidrolitik aktiviteden ötürü CTX-M-1 (Sefotaksimaz-1) adını verdikleri bir beta-laktamaz saptamışlardır. Aynı dönemlerde Güney Amerika'da da sefotaksime dirençli *Salmonella* izolatlarına bağlı bir salgın bildirilmiştir (31,98). Bu izolatlarda sefotaksim direncinden sorumlu beta-laktamazların pI noktalarının >8.0 olduğu; seftazidime kıyasla sefotaksime karşı olan hidrolitik aktivitenin ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılığın daha yüksek olduğu görülmüştür.

1992 yılında Fransa'da İtalyan bir hastadan 1989 yılında izole edilmiş bir *E.coli* suşunda MEN adı verilen bir GSBL saptanmıştır (99). Aynı yıl Barthelemy ve arkadaşları (100) bu enzimin dizi analizini gerçekleştirmiş; TEM ve SHV'ye %39 oranında benzeyen bu enzime MEN-1 adını vermiştir. 1993 yılında Japonya'da Ishii ve arkadaşları (101), sefotaksime dirençli bir *E.coli* suşunda bu enzime % 83 oranında homoloji gösteren Toho-1 enzimini göstermişlerdir. 1996 yılında TEM ya da SHV olmayan bu iki enzimin dizi analizi ile CTX-M-1 ve MEN-1 enzimlerinin identik olup Toho-1'in de bunların bir varyantı olduğu ortaya konmuştur (102). Öte yandan Polonya'da Gniadkowski ve arkadaşları (103) aynı dönemde *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde CTX-M-1 varyantı olan CTX-M-3'ü tanımlamıştır. O dönemden bu yana GSBL'lerin hızla genişleyen bir ailesi olan CTX-M tipi enzimler farklı coğrafi bölgelere yayılmıştır ve özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülmektedir.

Plazmid ile taşınan CTX-M tipi enzimler sefotaksimi, seftazidim ve aztreonama kıyasla daha etkin bir biçimde hidrolize ederler. Bu GSBL'ler beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır ve tazobaktamın inhibitör aktivitesi diğerlerine kıyasla daha yüksektir (65).

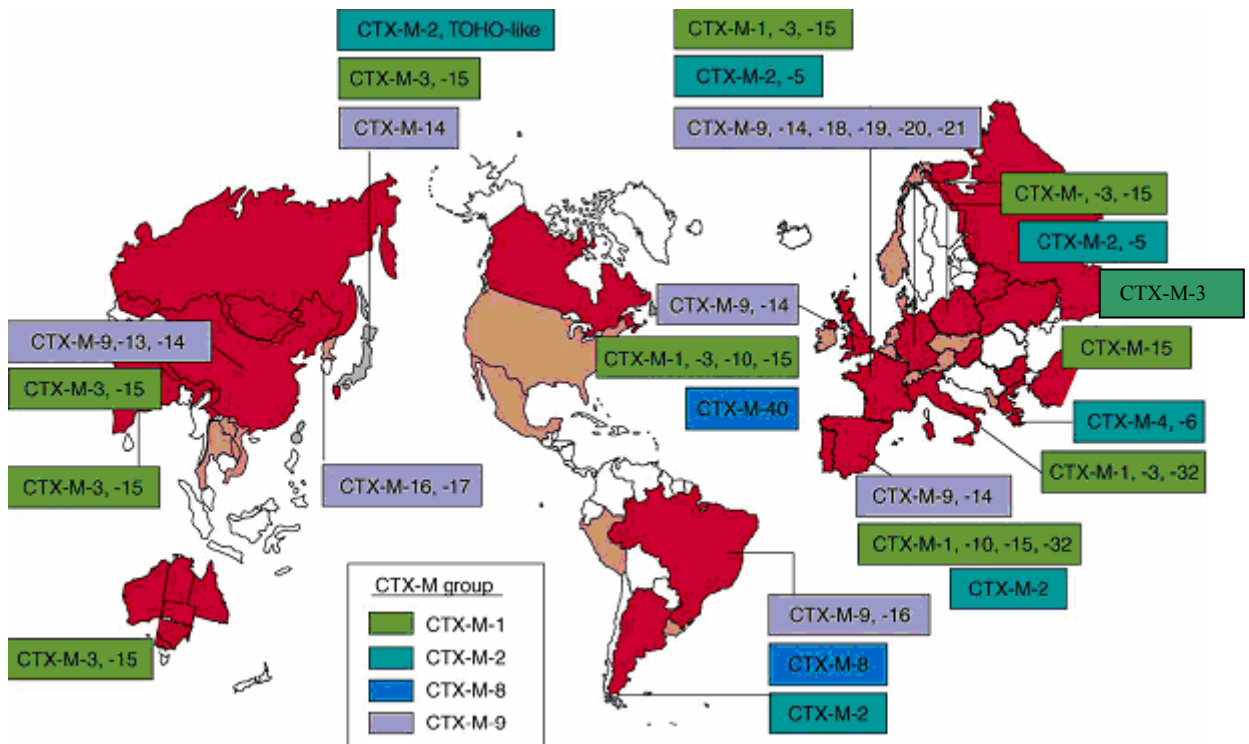
CTX-M grubu enzimler amino asit dizi benzerliğine göre 5 temel gruba ayrılmaktadır (Tablo 2). Bunlar CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 grubu enzimlerdir. CTX-M-2 ve CTX-M-8 üyelerinin %95-100 oranında *Kluyvera ascorbata* ve *Kluyvera georgina*'nın kromozomal beta-laktamazlarına benzerliği vardır (104).

ABD gibi bazı ülkelerde CTX-M üretimi sporadik olgular şeklinde olmakla beraber; birçok Avrupa ülkesinde endemik bir durumda olduğu göze çarpmaktadır. Farklı enzim gruplarının coğrafi dağılımı da değişiktir. Akdeniz havzası ülkelerde CTX-M-3 ve CTX-M-15; Portekiz, İspanya ve Britanya'da CTX-M – 9 ve CTX-M-14 ,Güney Amerika, Rusya ve

Japonya’da CTX-M-2 saptanmaktadır (Şekil 5)(14,16-18,105-107). Ülkemizde de diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi CTX-M-3 ve CTX-M-15 bulunmaktadır.

Tablo 2: CTX-M grubu enzimler

Grup	Enzimler
CTX-M-1	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, FEC-1, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28
CTX-M-2	CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, Toho-1
CTX-M-8	CTX-M-8
CTX-M-9	CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27, Toho-2, CTX-M-24 ve CTX-M (JP0074)
CTX-M-25	CTX-M-25, CTX-M- 26



Şekil 6 : CTX-M enziminin coğrafi dağılımına ilişkin şekil (14 nolu kaynaktan alınmıştır).

İlk tanımlandığı 1986 yılından itibaren, özellikle de son 10 yıldır tüm dünyada hızla yayılan CTX-M grubu GSBL'ler sıklıkla *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve idrar izolatlarında ortaya çıkmaktadır (104). Bu enzimlerin hem hastane hem de toplum kökenli infeksiyonlarda yaygın oldukları göze çarpmaktadır (52,108). İlk toplum kökenli GSBL üreten bakteri, 1998 yılında İrlanda 'da yaşlı bir hastanın idrarından izole edilen nalidiksik asit dirençli *E.coli* suşudur (104). Olguda hastaneye yatış öyküsü bulunmamakla beraber tekrarlayan antibiyotik kullanım öyküsü mevcuttur.

Birleşik Krallıklar, Kanada ve İspanya'da yapılan surveyans çalışmalarında toplum kökenli *E.coli* izolatlarında CTX-M üretimi ve bunun yanı sıra gentamisin, trimetoprim – sulfametaksazol, tetrasiklin ve siprofloksasine çoklu direnç bildirilmiştir (108-110). Bu durumun tedavi seçeneklerini çok azalttığı açıktır (111).

CTX-M enziminin yayılımı spesifik klonlar ile değil de, çok sayıda klon ve hareketli genetik elemanlar aracılığı ile gerçekleşmektedir (14). Plazmid kökenli olan CTX-M enzimlerinin, aynı plazmid üzerinde ISEcp1 olarak adlandırılan bir IS elemanı varlığında yayılım hızının arttığı bildirilmektedir (112). CTX-M üreten bakterilerle hastane infeksiyonlarında artış görülmesinin nedeni, diğer GSBL'lerin aksine toplum kökenli enzimlerin hastane ortamına geçmesidir (14).

CTX-M tipi enzimlerin tüm dünyada önemli bir direnç sorununa yol açtığı açıktır. Bu enzimler daha çok sefotaksimaz niteliğinde olmakla birlikte son yıllarda etki spektrumu seftazidimi de kapsayacak şekilde genişlemiş olan varyantları bildirilmiştir (113). Bu nedenle çalışmamızda, ülkemizdeki farklı bölgelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerinde CTX-M tipi enzimlerin yayılımı ve bu yayılımdan sorumlu genetik elemanlar incelenmiştir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Suşlar

Çalışmaya merkez başına rastgele seçilmiş 10 suş olmak üzere Kasım 2002 – Temmuz 2003 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde izole edilmiş *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi 70 izolat alındı. İzolatların tür dağılımları; 31 *E.coli*, 24 *K.pneumoniae*, beş *K.ornitholytica*, iki *E. aerogenes*, dört *E.cloacae* bir *K.oxytoca*, iki *Proteus mirabilis* ve bir *Shigella sonnei* idi. İzolatların tümünün genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ürettiği Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre doğrulandı (114). Çalışmaya alınan izolatların tür tanımları, biyokimyasal ve üreme özelliklerinin yanı sıra, API 20 E sistem (Bio-Merieux, Fransa) kullanılarak doğrulandı.

4.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler

Tris-Borik asit-EDTA (TBE): 1litre 10X TBE tamponu için 108 gr Tris (Sigma, ABD), 55 gr Borik asit (Sigma, ABD), 900 ml distile suda eritildi ; üzerine 40 ml 0.5 M Na₂EDTA pH: 8 eklenir ve total volüm 1 litreye tamamlandı. 1X TBE haline getirmek için 1 :10 dilusyon yapıldı.

0.5 M fosfat tamponu: 7.8gr monobazik sodyum fosfat, 250 ml distile su içinde eritildi. 7.1 gr dibazik sodyum fosfat, 250 ml distile su çözülür. Bu iki çözelti eşit oranda karıştırılarak pH:7.0 olacak şekilde 0.5 M fosfat tamponu elde edildi.

4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Sefotaksim Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

4.3.1. Çalışmaya alınan suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:

Çalışmaya alınan suşların seftazidim, sefotaksim aztreonam, sefpodoksim, sefoksitin, sefotaksim, imipenem ve sefepim duyarlılıkları, CLSI önerileri doğrultusunda, disk difüzyon yöntemi ile belirlendi (114). Bu amaçla, 0,5 McFarland bulanıklık eşdeğerinde hazırlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton agar besiyerine (Oxoid, İngiltere) homojen olarak yayıldı. Üzerine, amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg),

aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefepim (30 µg), sefpodoksim (30 µg) ve sefoksitin (30 µg), antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) yerleştirilip, 16-18 saat inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü ve CLSI M100-S16 standardına göre duyarlılık kategorileri ve GSBL üretimi belirlendi (Tablo 3) (114a).

4.3.2. CTX-M pozitif suşların minimal inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi:

Bunun dışında Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ile *bla_{CTX-M}* geni taşıdığı saptanan suşların, sefotaksim Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri, CLSI önerilerine göre mikro-dilüsyon yöntemi ile saptandı (114). Üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MİK değeri olarak kabul edildi.

Tablo 3: CLIS M100-S16 standardına göre Enterobacteriaceae üyeleri için seçilen beta-laktam antibiyotiklerin zon çapları.

	R(Dirençli)	I(Intermediate)	S(Duyarlı)
CAZ	≤14	15-17	≥18
CTX	≤ 14	15-22	≥23
AMC	≤ 13	14-17	≥18
IMP	≤ 13	14-15	≥16
FOX	≤ 14	15-17	≥18
CPD	≤ 17	18-20	≥21
FEP	≤ 14	15-17	≥18
ATM	≤ 15	16-21	≥22

4.4. CTX-M Enziminin Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Yöntemiyle Araştırılması

4.4.1. Bakteri DNA eldesi:

CTX-M enziminin PZT yöntemiyle araştırılması amacıyla kullanılacak bakteri DNA'sı aşağıdaki yöntemle elde edildi:

i) Kanlı agarda 16-18 saatlik inkübasyonla canlandırılan bakterinin 500 µl steril deiyonize suda süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon, kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu.

ii) Tüpler standart masa-üstü santrifüjde 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PZT reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

4.4.2. PZT reaksiyonu:

4.4.2.1. PZT reaksiyon karışımının hazırlanması:

PZT reaksiyon karışımı 50 µl hacminde, aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı (Tablo 4) ve *bla* CTX-M enzimine ait primer dizgisi Tablo 6’da gösterilmektedir.

Tablo 4: CTX-M PZT reaksiyon karışımı

10X Enzim tamponu	5 µl (1x)
MgCl ₂	2.5 µl(1.25mM)
dNTPs	2µl(200 µM)
CTX-M - A	1.8 µl(13.8 pmol)
CTX-M -B	1.3 µl (13.3 pmol)
Taq polymerase (Fermentas, Litvanya)	0.5µl (2.5 U)
Steril deiyonize su	31.3µl
DNA	5µl

Amplifikasyon protokolü, PZT karışımının 3 dakika 94°C’de denatürasyonunun ardından, 30 siklus olacak şekilde; 1 dakika 94 C°’de denatürasyon, 1 dakika 50 °C’de birleşme, 2 dakika 72° C’de uzama ve son olarak da 10 dakika 72°C’de tutulması ile gerçekleştirildi.

4.4.2.2. PZT ürünlerinin görüntülenmesi:

PZT ürünleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren, 1X TBE tamponu) ile hazırlanmış %1’lik agaroz (Sigma, USA) jelde 120 volt’ta 45 dakika. yürütülüp ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntülendi. Bu işlem sırasında, Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Litvanya) oluşan bantların büyüklük belirleyicisi olarak kullanıldı.

4.5. GSBL-Pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin PZT ile Araştırılması

GSBL varlığı saptanan *Enterobacteriaceae* üyelerinde TEM ve SHV grubu enzimlerin varlığı, özgül primerler kullanılarak PZT yöntemiyle araştırıldı. Bu reaksiyonlarda kullanılan

kalıp DNA için; Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) üzerinde üreyen kolonilerden 5-10 tanesi 500 µl steril distile suda süspanse edilip, ardından kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Standart masa-üstü santrifüjde 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant PZT reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

TEM ve SHV enzimleri için, 50 µl’lik PZT reaksiyon karışımları aşağıdaki bileşenlerle hazırlandı (Tablo 5). *bla TEM* ve *blaSHV* ‘ye ait primer dizgisi Tablo 7’de gösterilmiştir:

Tablo 5: *blaTEM* ve *bla SHV* PZT reaksiyon karışımı

10X Enzim tamponu	5 µl (1x)
MgCl ₂	2.5 µl(1.25mM)
dNTPs	4µl(200 µM)
TEM-F/SHV-F	1 µl(20 pmol)
TEM-R/SHV-R	1µl (20pmol)
Taq polymerase (Fermentas, Litvanya)	0.5µl (2.5 U)
Steril deiyonize su	31µl
DNA	5µl

bla_{TEM} için amplifikasyon protokolü; 94°C’de 3 dakika, 30 siklus olacak şekilde 94°C’de 30 sn, 56° C’de 1 dakika, 72° C’de 2 dakika. ve 72°C’de 5 dakika şeklinde uygulandı. *bla_{SHV}* için ise; 94° C’de 3 dakika 30 siklus olacak şekilde 94° C’de 30 sn, 60.5 °C’de 30 sn, 72° C’de 1 dakika ve 72° C’de 5 dakika olarak gerçekleştirildi (Tablo 6). PZT ürünleri daha önce anlatıldığı gibi etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jelde yürüldü ve görüntülendi.

Tablo 6: PZT ve dizi analizi için kullanılan oligonükleotid dizileri

[illegible]

Tablo 7: CTX-M, TEM ve SHV için PZT reaksiyonları

	<i>bla CTX-M</i>	<i>bla-TEM</i>	<i>bla-SHV</i>
Reaksiyon karışımı	10XBuffer – 1x (5 µl) MgCl ₂ – 2.5 µl dNTPs – 200 µM CTX-M- A – 13.8 pmol CTX-M-B – 13.3 pmol Taq polymerase – 2.5 U DNA – 5 µl	10XBuffer – 1x MgCl ₂ -1.25 mM dNTPs – 200 µM TEM-F - 25 pmol TEM-R 25 pmol Taq polymerase – 2.5 U DNA – 5 µl	10XBuffer – 1x MgCl ₂ – 1.25 mM dNTPs – 200 µM SHV-F – 25 pmol SHV-R – 25 pmol Taq polymerase – 2.5 U DNA – 5 µl
PZT siklus	94 °C -3 dakika 94 °C – 1 dakika 50 °C – 1 dakika 72 °C – 2 dakika 72 °C – 10 dakika } X 30	94 °C – 3 dakika 94 °C – 30 sn 56°C – 30 sn 72 °C – 1 dakika 72 °C – 5 dakika } X 30	94 °C – 3 dakika 94 °C – 30 sn 60.5 °C – 30 sn 72 °C – 1 dakika 72 °C – 5 dakika } X 30
Kaynak	32	117	117

4.6. CTX-M Üreten İzolatların Klonal Yakınlıklarının ERIC-PZT ile Araştırılması

Bu amaçla bakteri hücrelerinden DNA eldesi için, Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) üzerinde üreyen kolonilerden Nucleospin Tissue® (Macherey Nagel Almanya) kiti kullanıldı.

4.6.1. ERIC-PZT'nin uygulanması:

“Enterobacterial repetitive intergenic consensus – ERIC” dizgilerine özgü ERIC-2 primeri (Tablo 6) kullanılarak PZT tekniğiyle izolatlar arasındaki klonal yakınlık araştırıldı (116). Bu amaçla 50 µl'lik reaksiyon karışımı aşağıdaki bileşenlerle oluşturuldu (Tablo 8):

Tablo 8: ERIC-PZT reaksiyon karışımı

10X Enzim tamponu	5 µl (1x)
MgCl ₂	5 µl(2.5mM)
dNTPs	5µl(200 µM)
ERIC-2	1 µl(25 pmol)
Taq polymerase (Fermentas, Litvanya)	0.5µl (2.5 U)
Steril deiyonize su	28.5µl
DNA	5µl

Bir siklus (94 °C’de 1 dakika.); 30 siklus (94°C’de 1 dakika., 45° C’de 1 dakika., 72° C’de 2 dakika.); ve 72 °C’de 5 dakika. olacak şekilde amplifikasyon basamağı uygulandı. Elde edilen ürünler, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren, 1X TBE tamponu ile hazırlanmış %1’lik agaroz (Sigma, USA) jelde 120 volt’ta 45 dakika. yürütüldü ve U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntülendi. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Litvanya) yardımıyla oluşan bantların moleküler büyüklükleri belirlendi.

4.6.2. İzolatların klonal yakınlıklarının araştırılması ve dendogram çizilmesi:

$S_J = n_{AB} / (n_{AB} + a + b)$ (n_{AB} = A ve B suşlarında ortak olan bant sayısı, a = A suşunda olup B’de olmayan bant sayısı, b = B suşunda olup, A’da olmayan bant sayısı) formülüne göre hesaplanan Jaccard katsayısı esas alınarak, “Mega 2.1 versiyon” programında “UPGMA” (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemiyle, CTX-M üreten izolatlar için (her tür için ayrı olacak şekilde) dendogramlar oluşturuldu. S_J değeri 0 ile 1 arasında değişmektedir. 0 değeri hiç ortak bant olmadığını gösterirken ; 1 değeri tüm bantların ortak olduğunu göstermektedir (118). Eğer benzerlik $\geq$ %80 ise yani fark (1- Jaccard katsayısı) 0.2’den az ise suşlar ilişkili; benzerlik $\leq$ %80 ise farklı suş olarak kabul edildi. (118,119).

4.7. GSBL üreten suşlarda İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle beta-laktamazların saptanması:

İEO için Matthew ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (120). Buna göre; yatık Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere) besiyeri yüzeyinde üreyen bakteriler, 0.5 M fosfat tamponu ile toplanarak steril mikrosantrifüj tüplerine alındı. Ardından, 15 sn aralıklarla, “amplitude” değeri 60 olacak şekilde gerçekleştirilen sonikasyon işlemiyle (Sonics and Materials-VC 100,

ABD) bakteri hücre duvarları parçalandı. Buz üzerinde bekletilen bakteri sonikatlarının, +4°C’de, 7000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant İEO için kullanıldı.

İEO işlemi için poliakrilamid jel hazırlanması:

Distile su	25 ml
Akrilamid 100g + bisakrilamid 2.7 g (300 ml distile su)	9 ml
% 40 Amfolin (pH: 3-10 aralığında)(Sigma,ABD)	2 ml
% 5 N,N,N,N, tetra metil etilendiamin (TEMED)	0.2 ml
Riboflavin (2 mg / 100 ml distile su)	4.5 ml

Bakteri sonikatları, İEO jeline yüklenerek, bir gece; güç 1 watt, voltaj 180 V, akım: 20 mA olacak şekilde elektroforez uygulandı. Ardından, jel nitrosefin (500 µg/ml) ile kaplanarak, beta-laktamaz bantları görünür hale getirildi. Çalışmaya alınan izolatlardaki beta-laktamazların izoelektrik noktaları, bilinen kontroller (TEM-1 (pI:5.4), SHV-2 (pI:7.6), CTX-M-3 (pI: 8.4) ile karşılaştırılarak belirlendi.

4.8. CTX-M Enziminin Aktarılabirliğinin İncelenmesi

4.8.1. Konjugasyon Deneyleri:

bla_{CTX-M} geninin aktarılabirliğinin incelenmesi amacıyla, PZT ve İEO sonuçlarının CTX-M ile uyumlu çıktığı izolatlar ile streptomisine dirençli ve laktozu fermente etmeyen (lac-) bir *E. coli* K12 (J 62-2) suşunun kullanıldığı konjugasyon deneyleri uygulandı (121). Katı ortamdaki konjugasyon deneylerinde, alıcı ve verici suşlar Nutrient Broth (Merck, Almanya) besiyerinde bir gece 37 C°’de inkübe edilip 10:1 (10 ml alıcı suş: 0.1 ml verici suş) oranında karıştırıldı. Aynı zamanda, kontrol amacıyla, streptomisin (Sm) (1000 µg/ml) yanısıra sefotaksim (CTX) (2 µg/ml) veya ampisilin (Amp) (10 µg/ml) içeren Mueller Hinton agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine 100µl ekim yapıldı. Sıvı ortamda yapılan deneylerinde ise 10ml alıcı suş ve 0.1 ml verici suştan oluşan karışım 35°C’de 2 saat tutulduktan sonra, 3000 rpm’de (Kendro Laboratory Products, Heraeus-Labofuge 400R, Almanya) 20 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti 5.6 ml steril %0.85 NaCl ile süspanse edildi. Bu süspansiyondan, doğrudan veya 1/10 ve 1/100 oranlarında dilüsyonlar hazırlanarak, 100’er µl bakteri süspansiyonu antibiyotik içeren (Sm+Amp veya Sm+CTX)

plaklara aktarıldı. 35 C°’de bir gece inkübe edilen besiyerlerinde üreyen kolonilerden bir kez daha antibiyotikli besiyerlerine pasaj yapıldı. İkinci kez üreyen koloniler daha sonra antibiyotik içermeyen EMB agar (Merck, Almanya) besiyerlerine aktarıldı. EMB’de üreyen laktoz negatif kolonilerin diğer biyokimyasal özellikleri incelenerek traskonjugant olup olmadıkları değerlendirildi. Transkonjugantlarla yapılan ek deneylerle plazmid içerikleri, PZT ile *bla*_{CTX-M} varlığı ve beta-laktamazların izoelektrik noktaları araştırıldı

4.8.2. Plazmid İzolasyonu:

Transkonjugantlarda “Nucleospin-Plazmid” kiti (Macherey-Nagel TM, Almanya), kullanarak plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Ticari kitle çalışılırken üreticinin önerileri doğrultusunda hareket edildi.

Uygulama sonunda elde edilen plazmid suspansiyonundan 20 µl alınıp, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren % 0.8’lik agaroz (Sigma, ABD) jele yüklenerek 120 volt’ta 1 saat yürütüldü ve plazmid bantları U.V. ışık kaynağı yardımıyla görüntülendi. Elektroforez sırasında, λ DNA / Hind III (Fermentas, Litvanya), moleküler büyüklüklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

4.9. DNA Dizi Analizi

*bla*_{CTX-M} pozitif çıkan suşlardan her bir merkez için üçer izolat seçilerek toplam 21 izolattan *bla*_{CTX-M} dizi analizi primerleri; (Tablo 6) ile PZT uygulandı. Her iki DNA ipliğinin dizi analizi “BigDye TM terminator”(ABI Prism,ABD) kiti ve otomatik 3730xl DNA dizi analizörü kullanılarak Macrogen Inc.(Güney Kore) firmasınca gerçekleştirildi.

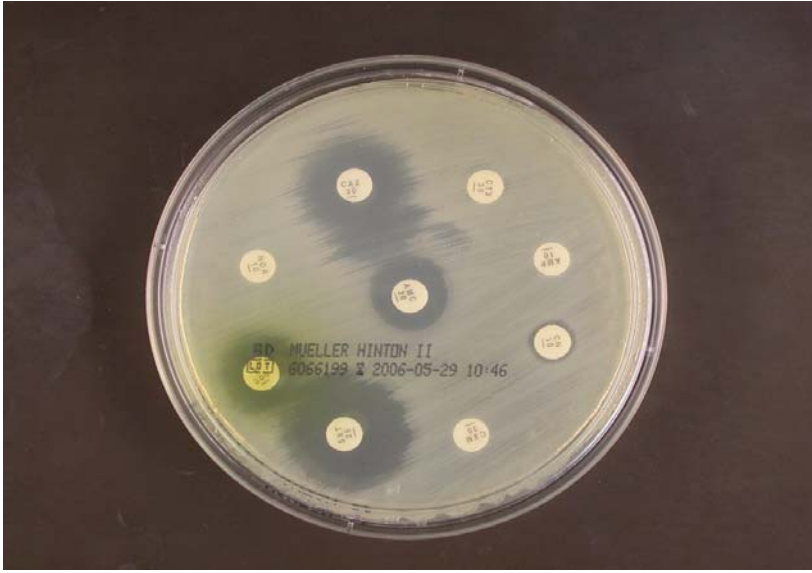
4.10. PZT Yöntemiyle CTX-M ailesinden diğer GSBL’lerin araştırılması

Çalışmaya alınan izolatlarda; CTX-M ailesinden diğer enzimlerin varlığı, CTX-M-9, CTX-M-2 ve CTX-M-8 özgül primerlerle araştırıldı (Tablo 6).

5. BULGULAR

5.1. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları:

Çalışmaya 7 farklı merkezden izole edilen ve merkez başına 10 suş olacak şekilde seçilen GSBL pozitif 70 izolat alındı. Bu suşlardan 31'i *E.coli*, 24'ü *K.pneumoniae*, beşi *K.ornitholytica*, biri *K.oxytoca*, dördü *E.cloacae*, ikisi *E.aerogenes*, ikisi *Proteus mirabilis* ve biri *S.sonnei*'dir. Merkezlerden toplanan *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık paternleri Tablo 9a-9g arasında verilmektedir. GSBL paterni gösteren bir *E.coli* suşu Şekil 7'de gösterilmektedir.



Şekil 7: GSBL paterni gösteren bir *E.coli* suşu

(Tablo 9a-9g’de sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), sefoksitin (FOX), amoksisilin – klavulanik asit (AMC), sefpodoksim (CPD) ve sefepim (FEP) olarak belirtildi)

Tablo 9a :Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
TRE 56(<i>E.coli</i>)	25	13	28	18	18	0	25	17
TRE 154(<i>K.ornitholytica</i>)	0	0	30	17	0	0	15	14
TRE 90(<i>K.ornitholytica</i>)	0	0	28	0	0	0	21	20
111(<i>E.aerogenes</i>)	0	0	28	0	15	0	0	20
TKP 14(<i>K.pneumoniae</i>)	20	0	27	13	17	0	20	14
TKP 7(<i>K.pneumoniae</i>)	26	13	27	20	20	0	26	19
126(<i>K.ornitholytica</i>)	20	0	28	16	19	0	21	17
TKP 22 (<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	27	20	0	0	21	16
TRE 164(<i>K.pneumoniae</i>)	15	11	26	20	11	0	25	23
TRE073(<i>E.coli</i>)	13	12	30	0	12	0	25	20

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden seçilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü sefotaksime, yedisi seftazidime dirençlidir. Tüm izolatların karbapenemlere duyarlı olduğu gözükmemektedir.

Tablo 9b: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden seçilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir).

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
K24(<i>E.coli</i>)	12	8	38	18	12	0	26	12
K17(<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	32	17	0	0	25	16
K38(<i>K.pneumoniae</i>)	19	0	27	16	12	0	23	11
K44(<i>E.cloacae</i>)	20	15	24	18	12	0	0	20
K11(<i>K.pneumoniae</i>)	11	0	30	20	12	0	25	15
K51(<i>E.coli</i>)	20	0	28	20	21	0	20	15
K34(<i>E.coli</i>)	0	0	25	14	0	0	24	12
K21(<i>E.coli</i>)	25	0	30	18	18	0	25	17
K2(<i>E.coli</i>)	15	0	30	16	15	0	15	13
K32(<i>K.pneumoniae</i>)	17	0	29	20	16	0	25	15

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının da tümü sefotaksime dirençli iken seftazidim direnç oranı %60'dır. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden seçilen izolatlarda olduğu gibi bu izolatların da tümü imipeneme duyarlıdır. Yine bir *E.coli* suşunda FOX çapının dar olduğu görülmektedir. Bu durum ya dış membran değişikliklerine ya da plazmid kökenli bir sefalosporinaza bağlı olabilir.

Tablo 9c: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir).

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
B5(<i>E. cloacae</i>)	0	0	28	11	0	0	0	15
B10(<i>E. coli</i>)	19	0	28	0	15	0	0	20
B12(<i>K. oxytoca</i>)	0	0	28	12	0	0	22	17
B37(<i>E. coli</i>)	25	27	28	20	20	25	26	30
B19(<i>P. mirabilis</i>)	15	15	29	0	14	0	0	25
B34(<i>K. pneumoniae</i>)	20	15	30	20	25	0	25	20
B32(<i>K. pneumoniae</i>)	16	0	30	16	15	0	17	11
B22(<i>K. pneumoniae</i>)	16	0	28	15	0	0	10	0
B9(<i>E. coli</i>)	15	0	29	12	15	0	10	0
B1(<i>K. pneumoniae</i>)	25	11	26	20	19	0	26	16

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden seçilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının B37 hariç tümü sefotaksime dirençlidir. Bu izolatta GSBL saptanmadı.

B19 izolatında da GSBL varlığı saptanmamış olup kromozomal direnç vardır.

Uludağ suşları arasında FOX dirençli *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *P.mirabilis* suşlarının yaygınlığı bu merkezde plazmid kökenli bir AmpC sıklığının yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 9d: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir)

HACETTEPE TIP FAKÜLTESİ	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
H2 (<i>K. pneumoniae</i>)	20	0	26	13	12	0	25	11
H25 (<i>E. coli</i>)	15	0	31	16	10	0	24	12
H30 (<i>K. pneumoniae</i>)	0	11	23	20	0	0	25	18
H33 (<i>E. coli</i>)	13	0	28	15	0	0	25	0
H1 (<i>E. coli</i>)	0	0	27	17	0	0	23	0
H37 (<i>E. coli</i>)	0	0	28	18	0	0	27	16
H23 (<i>K. pneumoniae</i>)	0	0	27	16	0	0	23	12
H21 (<i>K. pneumoniae</i>)	0	0	24	17	0	0	25	13
H13 (<i>E. coli</i>)	0	18	27	18	0	0	20	17
H9 (<i>S. sonnei</i>)	25	15	30	23	25	0	30	21

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü sefotaksime ve sefpodoksime dirençliydi. Seftazidime %80, sefepime %80 aztreonama %90 dirençlidir.

Tablo 9e: İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir).

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
C21(<i>E.coli</i>)	23	0	25	0	20	0	25	20
C33(<i>E.coli</i>)	15	0	31	20	16	0	25	15
C17(<i>E.coli</i>)	0	0	30	16	0	0	20	15
C1(<i>E.coli</i>)	21	0	30	20	16	0	25	16
C8(<i>K.ornitholytica</i>)	0	0	30	20	0	0	0	0
C34(<i>E.coli</i>)	0	0	28	18	0	0	25	0
C40(<i>K.pneumoniae</i>)	12	0	25	15	15	0	15	0
C26(<i>E.coli</i>)	0	17	30	15	0	0	22	15
C12(<i>E.coli</i>)	12	0	30	19	28	22	22	28
C7(<i>K.ornitholytica</i>)	15	0	30	16	8	0	16	12

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü sefotaksime dirençli ve imipeneme duyarlıydı. C12 nolu *E.coli* suşunun seftazidim ve sefotaksime dirençli olmasına karşın aztreonam ve sefepime duyarlı olarak gözükmemektedir.

Tablo 9f: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
11859(<i>E.coli</i>)	10	0	26	16	11	15	23	15
18185(<i>Enterobacter cloacae</i>)	0	0	21	0	17	0	0	15
15727(<i>K.pneumoniae</i>)	0	15	21	20	0	0	0	21
9224(<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	21	15	0	0	0	15
20769(<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	25	20	25	0	0	0
6875(<i>E.coli</i>)	0	20	30	16	17	0	30	30
28997(<i>E.coli</i>)	15	0	30	16	15	0	24	17
17290(<i>Enterobacter aerogenes</i>)	15	0	28	0	15	0	0	15
26559(<i>Enterobacter cloacae</i>)	10	20	28	20	17	0	0	25
30423(<i>E.coli</i>)	15	0	30	15	13	0	25	15

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden seçilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü sefotaksime dirençliydi. Dokuz Eylül izolatları arasında yer alan üç *K.pneumoniae* suşunda sefoksitin zon çapları sıfır olarak bulundu. Bu durum plazmid kökenli AmpC üretimine bağlı olabilir.

Tablo 9g: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden gelen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tür dağılımı ve beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık paternleri (zon çapları mm olarak belirtilmiştir).

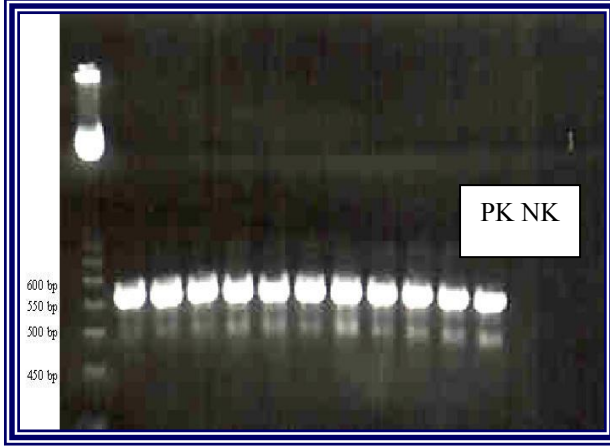
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	CAZ	CTX	IMP	AMC	ATM	CPD	FOX	FEP
E9(<i>E.coli</i>)	20	0	30	20	20	0	21	16
E6(<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	27	17	0	0	24	17
E24(<i>K.pneumoniae</i>)	23	23	25	15	15	15	25	25
E44(<i>E.coli</i>)	21	0	27	18	20	0	20	17
E4(<i>E.coli</i>)	14	0	28	12	10	0	23	10
E35(<i>E.coli</i>)	17	22	30	25	25	0	30	20
E11(<i>P.mirabilis</i>)	0	0	21	15	19	0	22	18
E13(<i>K.pneumoniae</i>)	0	0	26	20	0	0	27	22
E19(<i>K.pneumoniae</i>)	10	0	24	12	0	0	23	12
E25(<i>E.coli</i>)	10	0	22	16	0	0	24	12

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden seçilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü seftazidim vesefotaksime dirençli ya da 'ortada' ('intermediate') bulunmuştur. Bu durum aztreonam ve sefepim için de geçerlidir. Diğer üniversitelerden gelen izolatlarda olduğu gibi tümü sefpodoksime dirençli ve imipeneme duyarlıdır.

5.2. PZT Yöntemiyle CTX-M Enziminin Saptanması

Çalışmaya alınan 70 bakteride, CTX-M enzim varlığı *bla_{CTX-M}*'e özgü CTX-MA ve CTX-MB primerleri kullanılarak PZT yöntemiyle CTX-M enzim varlığı araştırıldı. Elli üç suşta, *bla_{CTX-M}* ile uyumlu 550 bp'lik PZT ürününü saptandı (Şekil 8). *bla_{CTX-M}* varlığı belirlenen suşların 24'ü *E.coli*, 20'si *K.pneumoniae*, biri *Enterobacter aerogenes*, 2'si *Enterobacter cloacae*, 5'i *K.ornitholytica* ve biri de *S.sonnei* idi. Çalışmaya alınan *E.coli* suşları arasında *bla_{CTX-M}* saptananların oranı %77.4, *K.pneumoniae* suşlarında ise %83.3 olarak bulundu. Merkezlere göre CTX-M enzim varlığı farklılık göstermekle birlikte %50-100 arasında değiştiği saptandı. Merkezlere göre en düşük oran Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, en yüksek oranın Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden gelen izolatlarda bulunduğu gözlemlendi. İzmir'de bulunan iki üniversite hastanesinden elde edilen izolatlarda *bla_{CTX-M}* oranlarının benzer olduğu belirlendi (%60 ve %70). İç Anadolu'da yer

alan iki üniversite hastanesinde ise (Hacettepe ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi) *bla*_{CTX-M} varlığı açısından en yüksek oranlara sahip oldukları (%100 ve %90) izlenmiştir. Merkezlere ve türlere göre CTX-M enzimi saptanan suşların dağılımı Tablo 9’da görülmektedir.



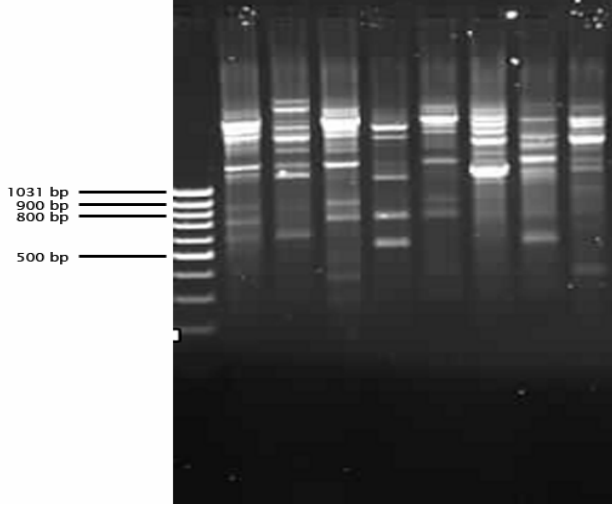
Şekil 8: CTX-MA ve CTX-MB primerleriyle yapılan PZT sonucu elde edilen ürünler M: Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

Tablo 10 : Merkezlere ve türlere göre CTX-M enzimi saptanan suşların dağılımı ve yüzdesi.

TÜR	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi		Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi		Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi		Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi		İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi		Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi		Ege Üniversitesi Tıp fakültesi			
	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	İncelenen suş	<i>bla</i> CTX-M	Toplam incelenen suş	Genel <i>bla</i> CTX-M
<i>E.coli</i>	5	4 (%80)	5	5 (%100)	2	1 (%50)	3	1 (%33)	7	5 (%71.4)	4	4 (%100)	5	4 (%80)	31	24 (%77.4)
<i>K.pneumoniae</i>	4	4 (%100)	4	4	4	3 (%75)	4	3 (%75)	1	1 (%100)	3	2 (%66.6)	4	3 (%75)	24	20 (%83.3)
<i>K.oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>K.ornitholytica</i>	-	-	-	-	3	3 (%100)	-	-	2	2 (%100)	-	-	-	-	5	5 (%100)
<i>E.aerogenes</i>	-	-	-	-	1	1 (%100)	-	-	-	-	1	-	-	-	2	1 (%50)
<i>E.cloacae</i>	1	1	-	-	-	-	1	1 (%100)	-	-	2	-	-	-	4	2 (%50)
<i>P.mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	2	-
<i>S.sonnei</i>	-	-	1	1 (%100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (%100)
TOPLAM	10	9 (%90)	10	10 (%100)	10	8 (%80)	10	5 (%50)	10	8 (%80)	10	6 (%60)	10	7 (%70)	70	53 (%75.7)

5.3. CTX-M Üreten İzolatların Klonal Yakınlıkları

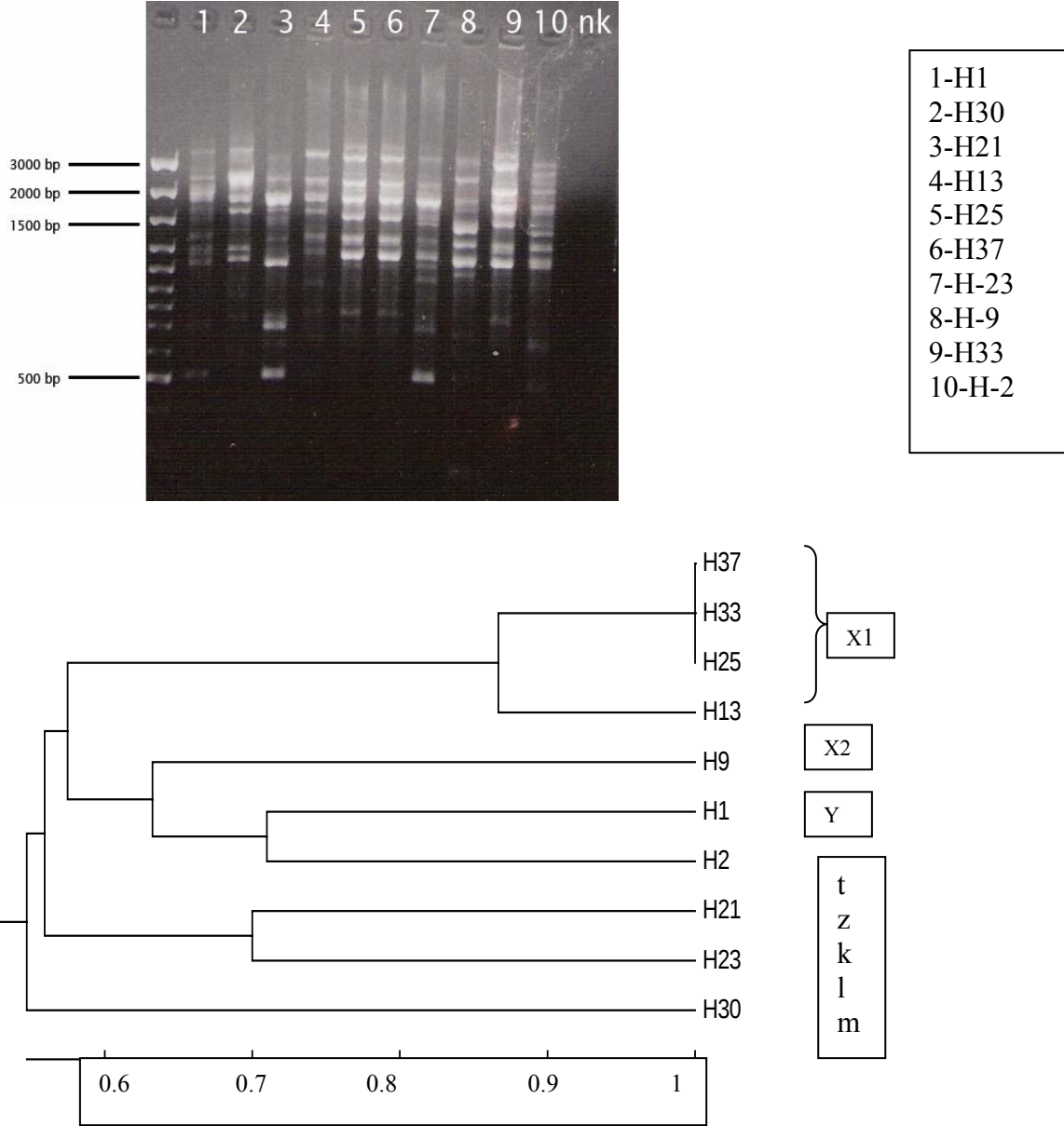
bla_{CTX-M} saptanan suşların klonal yakınlıkları, ERIC-PZT yöntemiyle araştırılmıştır. Jaccard katsayılarına göre tüm bantları birebir aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir ve iki bant farklılık gösteren izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi (Şekil-9).



Şekil-9 : *Enterobacteriaceae* ailesine ait suşlarının ERIC-PZT sonuçları (Farklı paternlere ait bazı örnekler yer almaktadır)

“Jaccard” katsayısı esas alınarak “Mega 2.1” programında “UPGMA” yöntemiyle oluşturulan 7 merkezin ERIC PZT sonuçları ve merkezlerin dendogramları 5.3.1-5.3.7. nolu alt başlıklarda; ayrıca tüm merkezlerin ERIC PZT sonuçlarını gösteren Şekil 17’de ve genel dendogram 5.3.8 nolu alt bölümde yer almaktadır. Şekiller ve ağaçlarda (dendogramlarda) görüldüğü gibi *bla_{CTX-M}* saptanan *Enterobacteriaceae* izolatlarının çoğu farklı klonun üyesiydi. Bu verilere göre merkezler arasında bir yayılım saptanmadı; ancak bazı merkezlerin kendi içinde birkaç izolatlık kümelenmeler gösterdiği bulundu.

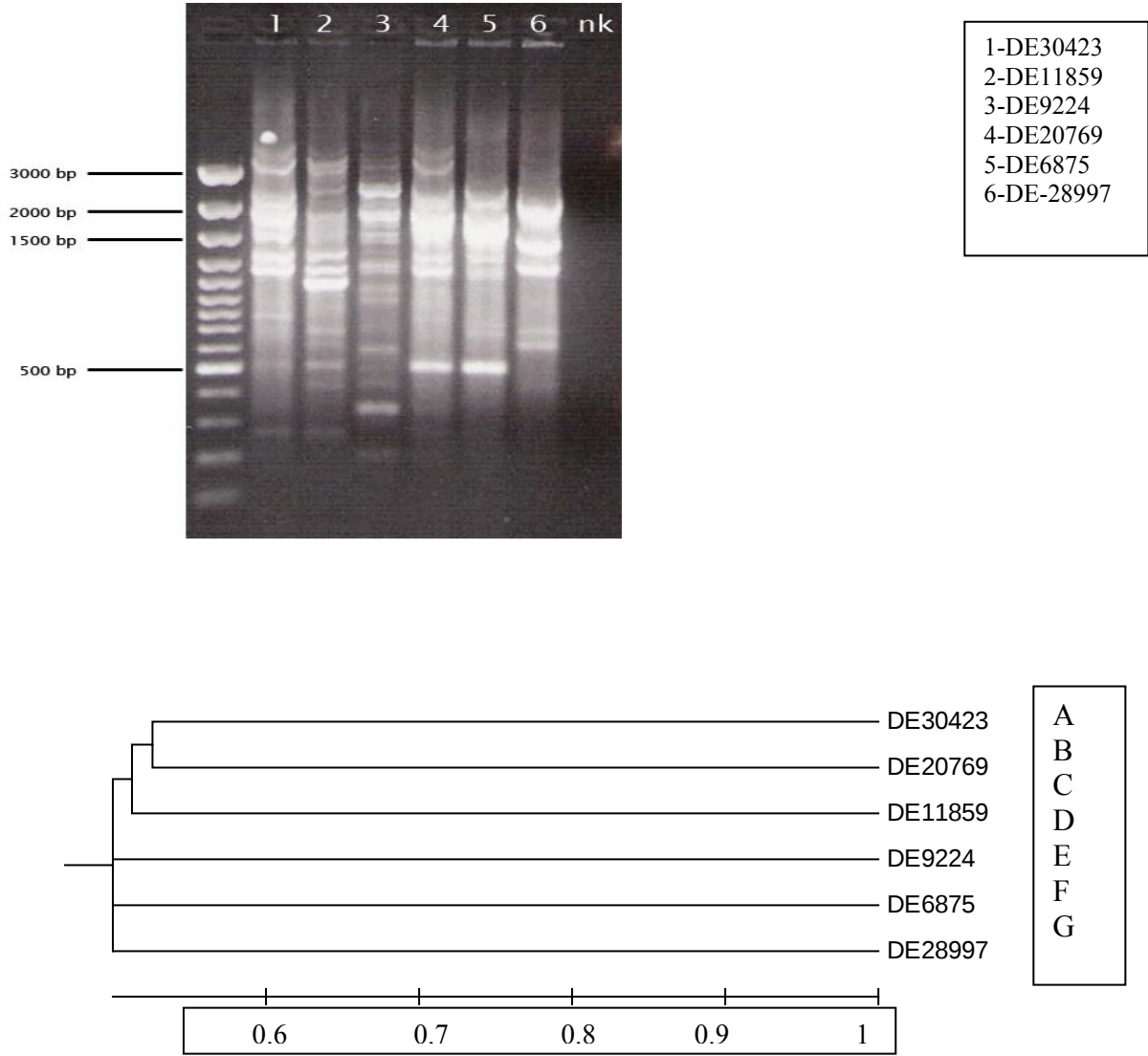
5.3.1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 10a-10b: Hacettepe Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (10a) ve dendrogram (10b)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif *E.coli* izolatlarından H37, H33 ve H25 arasında klonal yakınlık görülmektedir. Diğer izolatlar için böyle bir durum mevcut değildir.

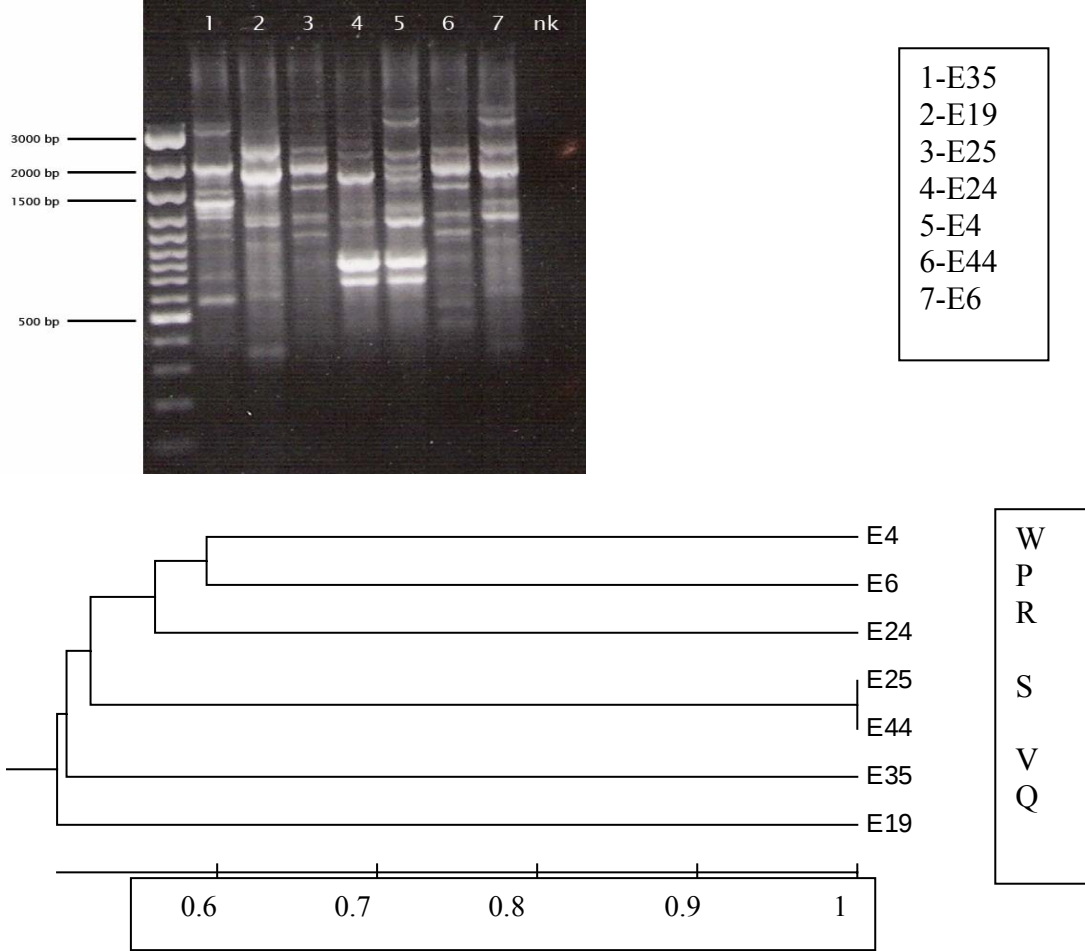
5.3.2. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 11a-11b: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne (DEÜTF) ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel (11a)görüntüsü ve dendogramı(11b)

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların değerlendirilmesinde klonal yakınlık gözlenmedi.

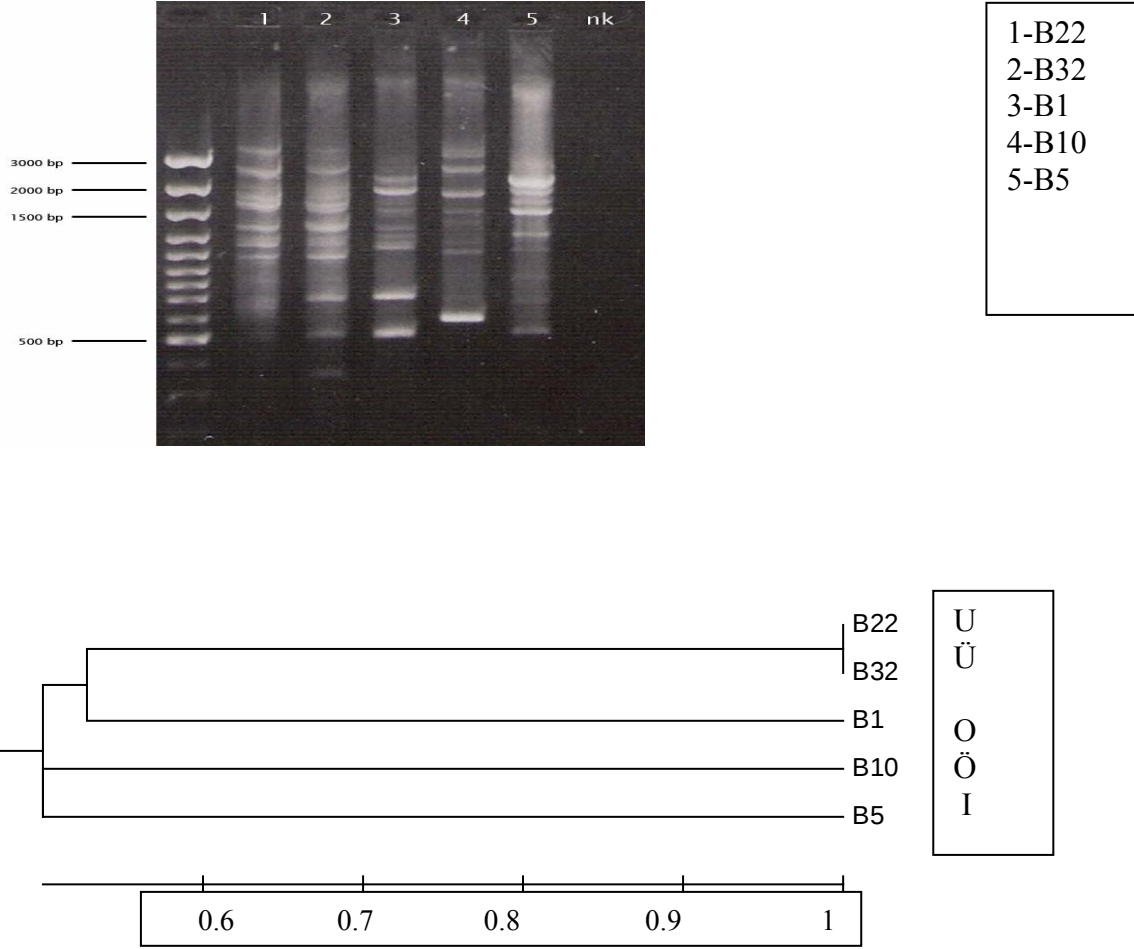
5.3.3. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 12a-12b: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların (12a) ERIC-PZT jel görüntüsü ve dendrogram (12b).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların değerlendirilmesinde E25 ve E44 nolu *E.coli* suşları haricinde klonal yakınlık gözlenmedi.

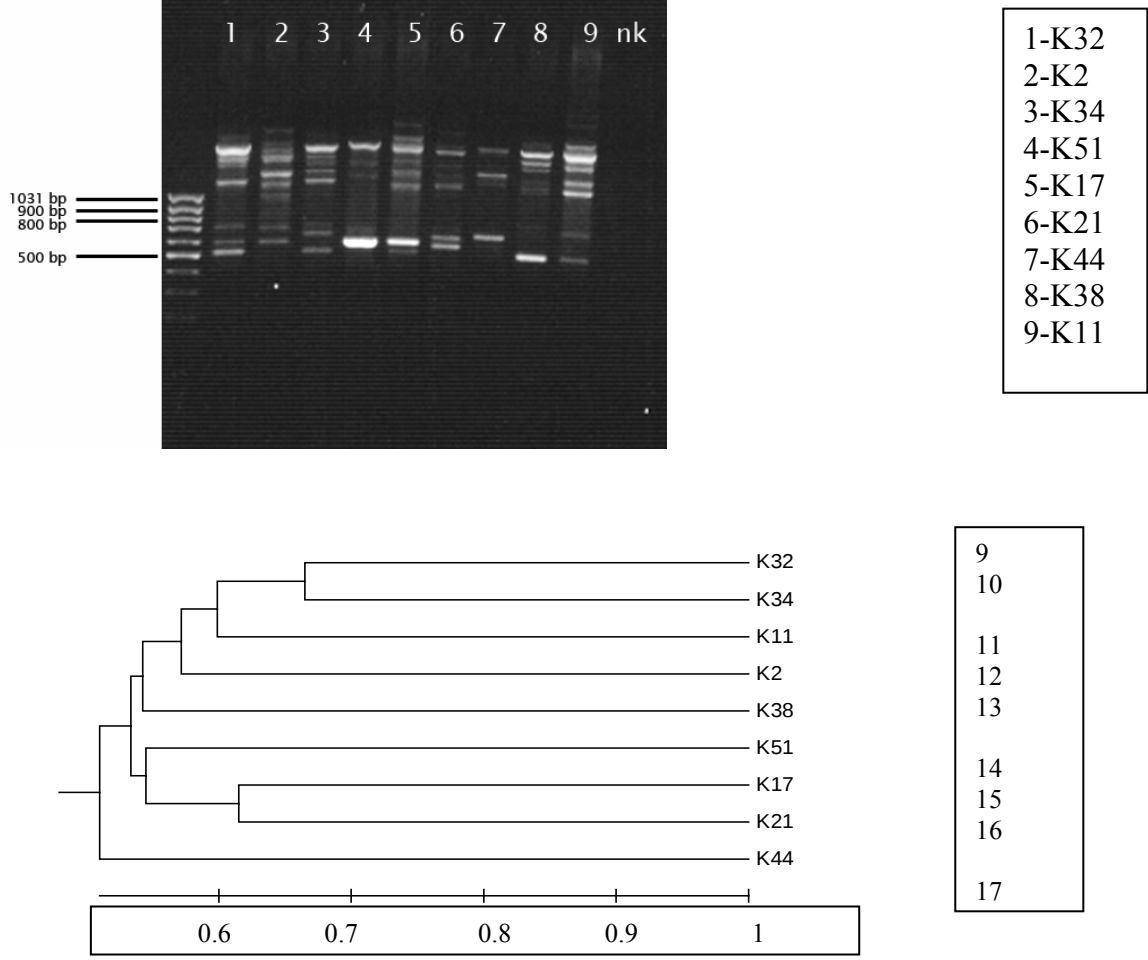
5.3.4. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 13a-13b : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesine ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (13a) ve dendogramı (13b)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşlardan B22 ve B32 nolu *K.ornitholytica* izolatları hariç klonal yakınlık gözlenmedi.

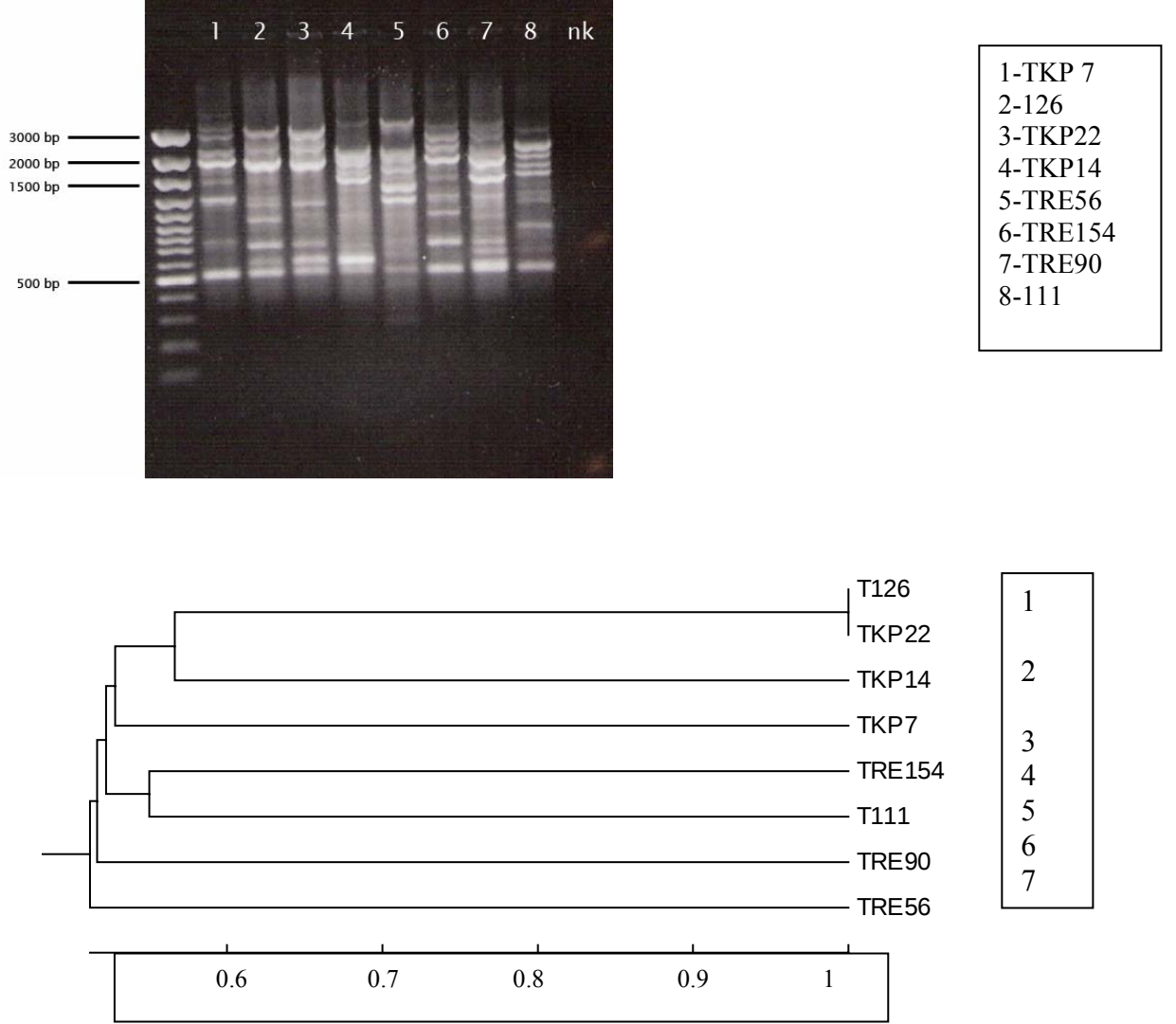
5.3.5. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 14a-14b: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (14a) ve dendrogramı(14b)

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların değerlendirilmesinde klonal yakınlık gözlenmedi.

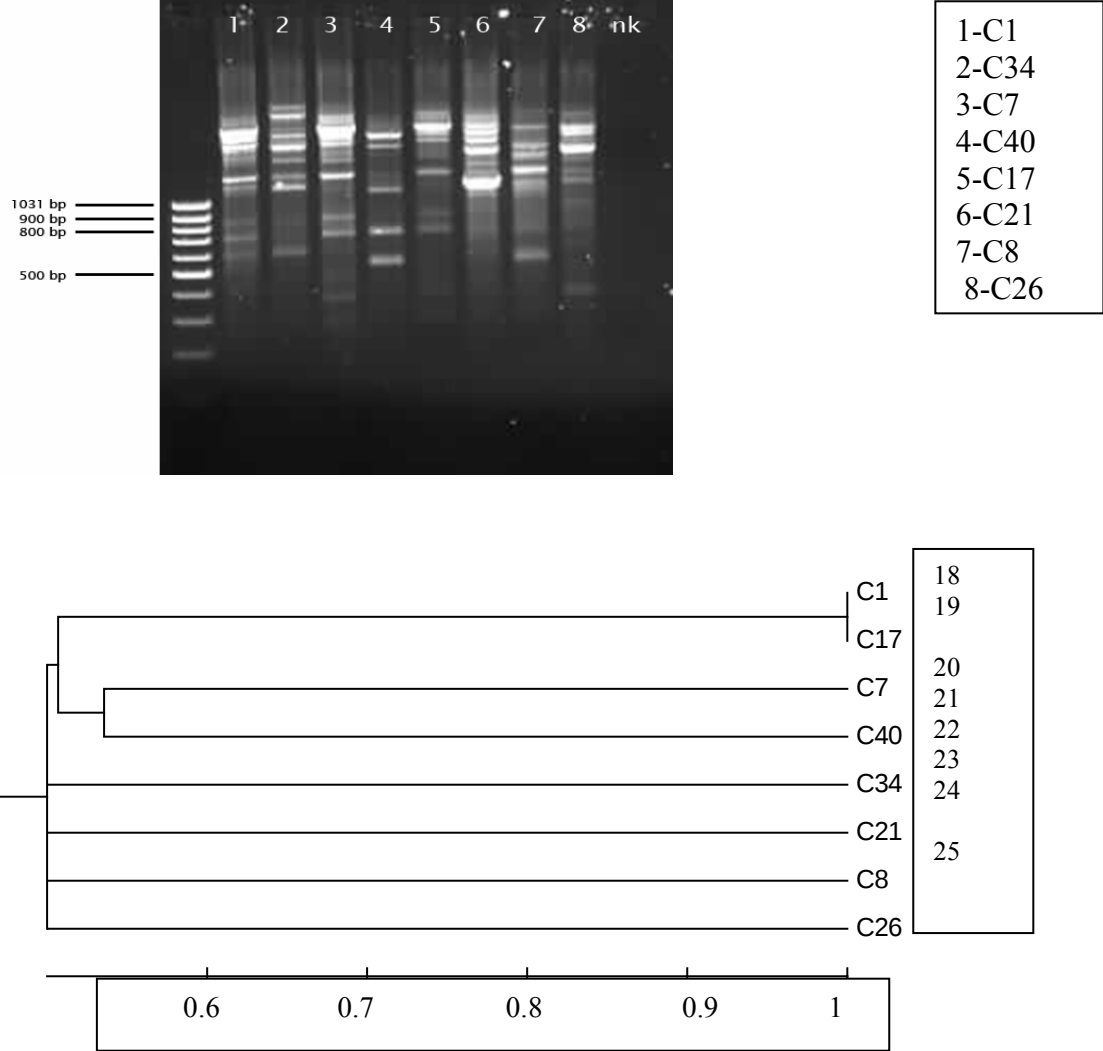
5.3.6. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 15a-15b : Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (15a) ve dendogramı (15b)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların değerlendirilmesinde 126 ve TKP 22 nolu *K.pneumoniae* suşları haricinde klonal yakınlık gözlenmedi.

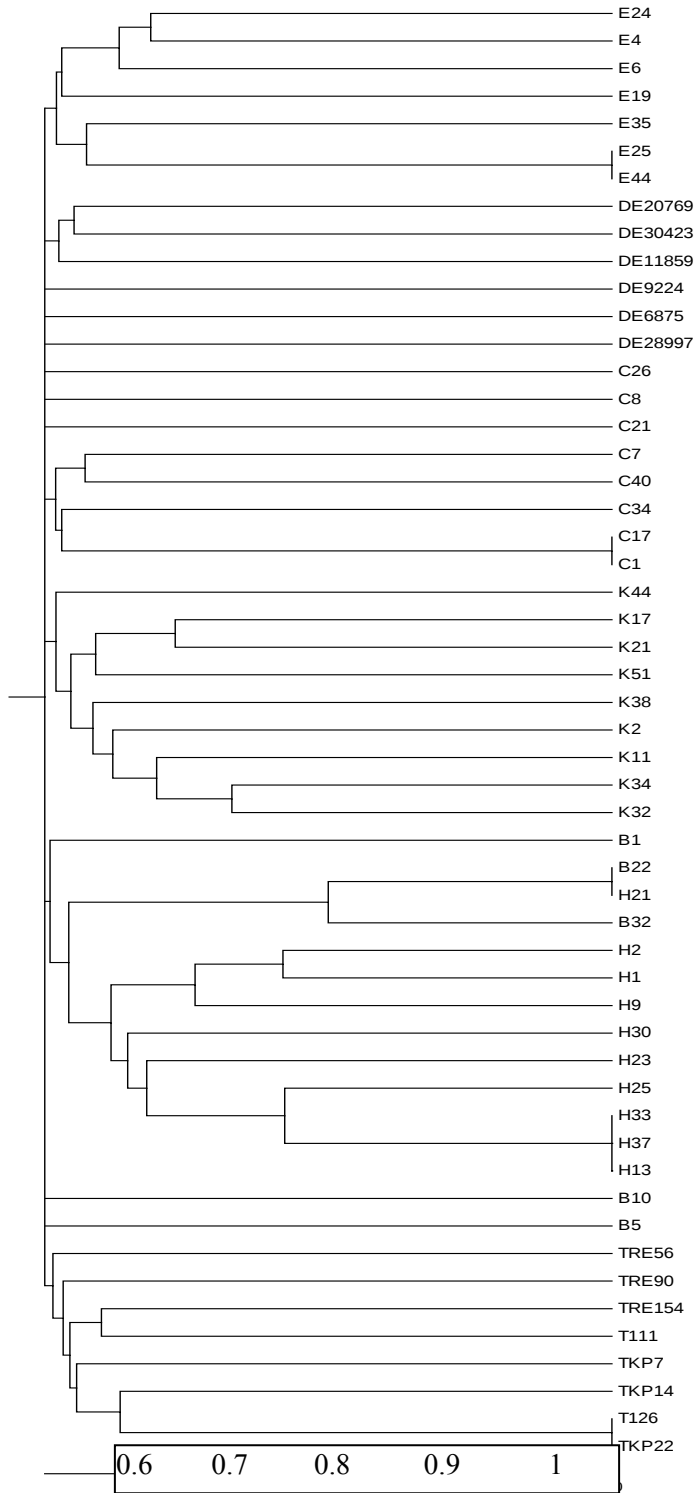
5.3.7. İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif izolatlar:



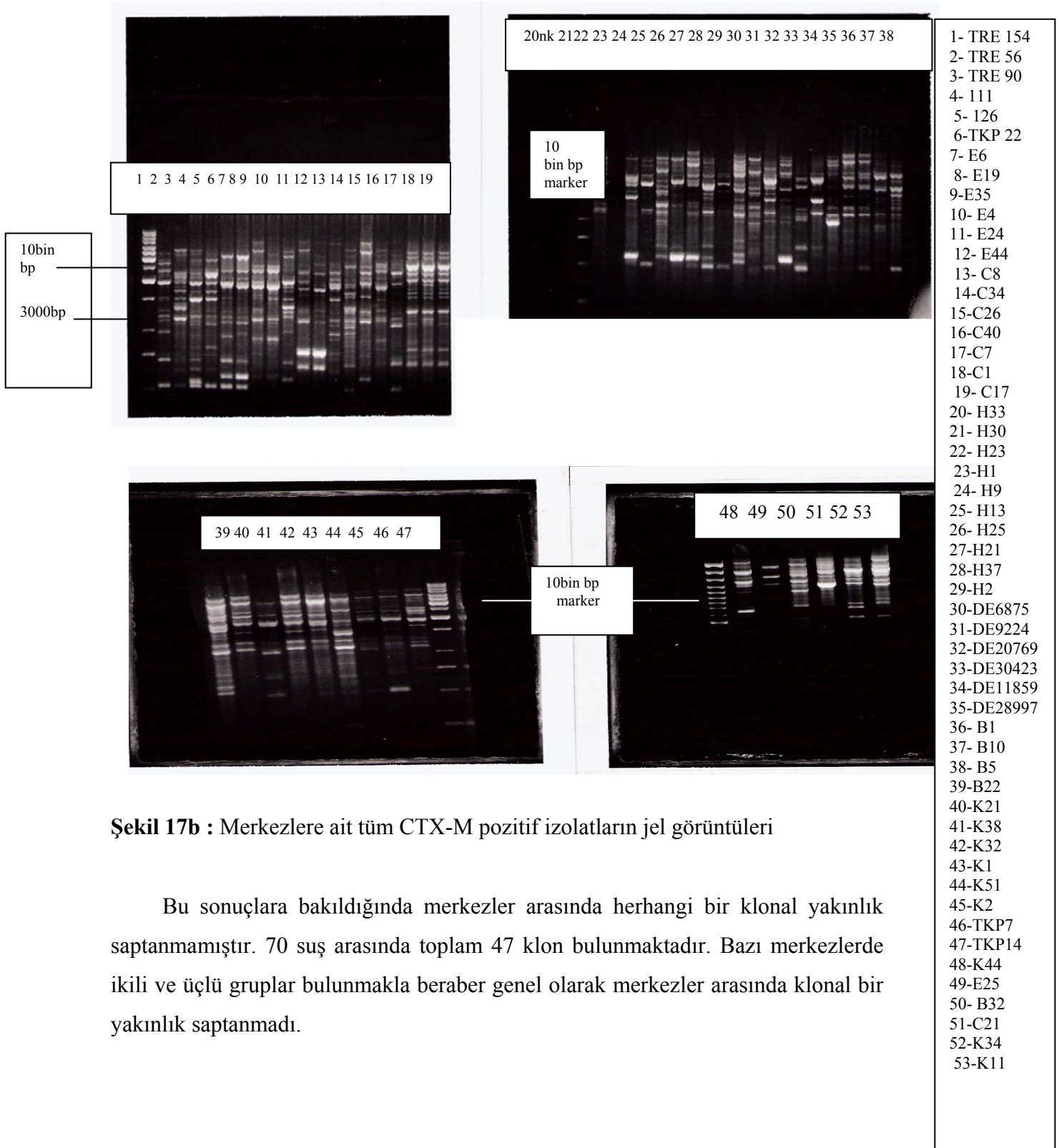
Şekil 16a-16b : Çapa Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların ERIC-PZT jel görüntüsü (16a) ve dendrogramı (16b)

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'ne ait CTX-M pozitif suşların değerlendirilmesinde C1 ve C17 nolu *E.coli* suşları haricinde klonal yakınlık gözlenmedi.

5.3.8. Tüm merkezlere ait CTX-M pozitif izolatlar:



Şekil 17a : Merkezlere ait tüm CTX-M pozitif izolatların dendogramı

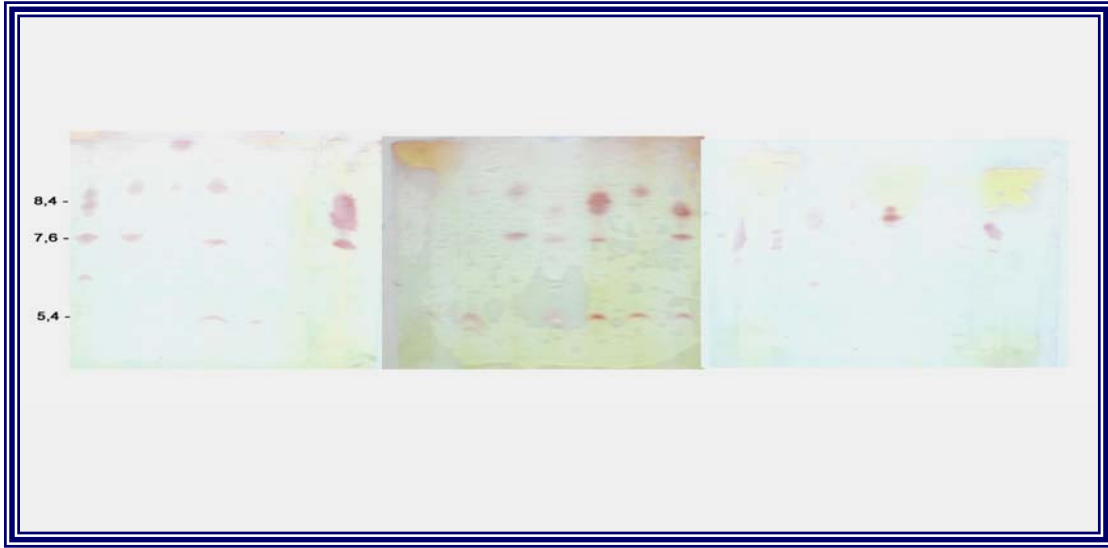


Şekil 17b : Merkezlere ait tüm CTX-M pozitif izolatların jel görüntüleri

Bu sonuçlara bakıldığında merkezler arasında herhangi bir klonal yakınlık saptanmamıştır. 70 suş arasında toplam 47 klon bulunmaktadır. Bazı merkezlerde ikili ve üçlü gruplar bulunmakla beraber genel olarak merkezler arasında klonal bir yakınlık saptanmadı.

5.4. CTX-M Enziminin İzoelektrik Odaklama (İEO) Yöntemiyle Araştırılması

Merkezlere göre, *bla*_{CTX-M} saptanan suş sonikatları hazırlandı. İzoelektrik noktaları bilinen, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen suşların sonikatları aynı İEO jeline yürütüldü. İncelenen tüm suşlarda, CTX-M enzimiyle aynı hizada (pI: 8.4) bant oluştuğu saptandı (Şekil-18).



Şekil-18: İzoelektrik noktaları bilinen, CTX-M, TEM-1 ve SHV-2 gibi beta-laktamazları sentezleyen kontrol suşlarıyla, seçilen bazı izolatların İEO jeli görüntüsü pI: İzoelektrik nokta

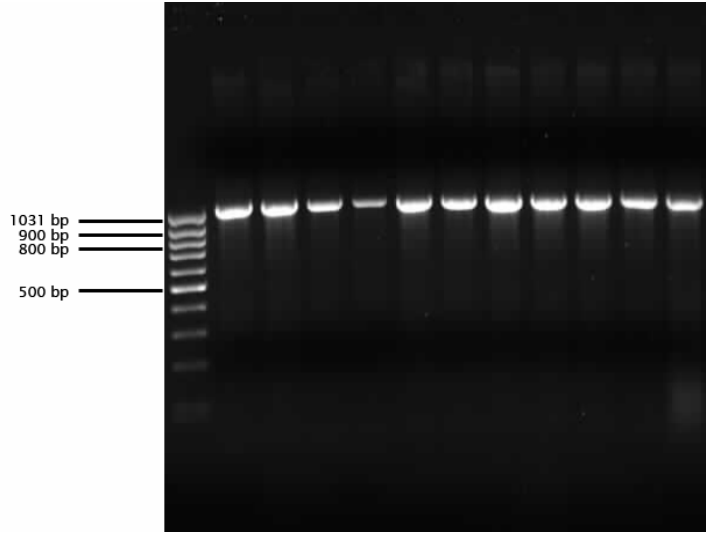
Kuyucuk 1 : CTX-M-3

Kuyucuk 2 : SHV-2

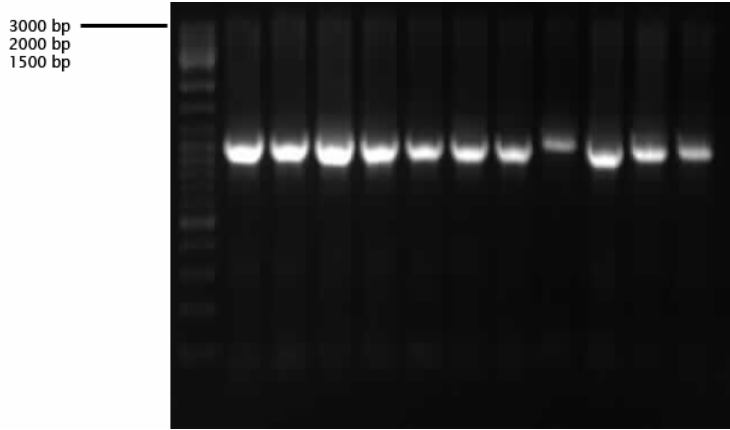
Kuyucuk 5 ve 13 : TEM-1

5.5. GSBL-Pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerinde TEM ve SHV Grubu Enzimlerin Varlığı

Antibiyoqram plaklarında GSBL pozitifliği saptanan *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde TEM ve SHV enzimlerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak PZT yöntemi ile araştırıldı. Yetmiş suşun 57'sinde (% 81.4) *bla*_{TEM}, 64'ünde *bla*_{SHV} (%91.4) saptandı (Şekil- 19 ve Şekil 20).



Şekil- 19: Özgül primerlerle TEM grubu enzim geni saptanan bazı *Enterobacteriaceae* üyesi suşlar



Şekil- 20 : Özgül primerlerle SHV grubu enzim geni saptanan bazı *Enterobacteriaceae* üyesi suşlar

Tablo- 11a : Farklı merkezlere göre *Enterobacteriaceae* üyelerinde beta-laktamaz enzimlerinin dağılımı

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi	C21	C33	C17	C1	C26	C12	C34	C8	C40	C7
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae
TEM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SHV	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-M	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi	B10	B37	B32	B9	B12	B34	B22	B1	B19	B5
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	P.mirabilis	E.cloacae
TEM	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
SHV	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
CTX-M	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi	K24	K51	K34	K21	K2	K17	K38	K44	K11	K32
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae
TEM	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
SHV	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-m	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi	TRE56	TRE154	TRE73	TRE90	TKP14	TKP7	TKP22	111	126	TRE164
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	E.aerogenes	E.aerogenes	E.aerogenes
TEM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
SHV	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-M	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	DE11859	DE6875	DE28997	DE30423	DE15727	DE9224	DE20769	DE17290	DE26559	DE18185
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	Enterobacter spp.	Enterobacter spp.	Enterobacter spp.
TEM	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
SHV	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-m	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	Ege9	Ege25	Ege44	Ege4	Ege35	Ege6	Ege24	Ege13	Ege19	Ege11
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	P.mirabilis
TEM	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
SHV	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-M	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	H33	H37	H25	H13	H1	H21	H23	H30	H2	H9
	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	K.pneumoniae	S.sonnei
TEM	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
SHV	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CTX-M	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}
Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
53 (%75.7)	57 (%81.4)	64 (% 91.4)

Tablo 11b: Genel *bla*_{CTX-M} *bla*_{TEM} *bla*_{SHV} oranları

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %100 oranında *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV} ve %100 *bla*_{CTX-M}; Ege Üniversitesi %80 *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV}, %70 *bla*_{CTX-M}, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi %100 *bla*_{TEM} %90 *bla*_{SHV}, %80 *bla*_{CTX-M}; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %80 *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV}, %50 *bla*_{CTX-M}, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %70 *bla*_{TEM}, %100 *bla*_{SHV}, %90 *bla*_{CTX-M}, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %100 *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV}, %80 *bla*_{CTX-M}, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %60 *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV}, %60 *bla*_{CTX-M}, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde ise %80 *bla*_{TEM}, %90 *bla*_{SHV}, %70 *bla*_{CTX-M} beta-laktamaz varlığı saptanmadı.

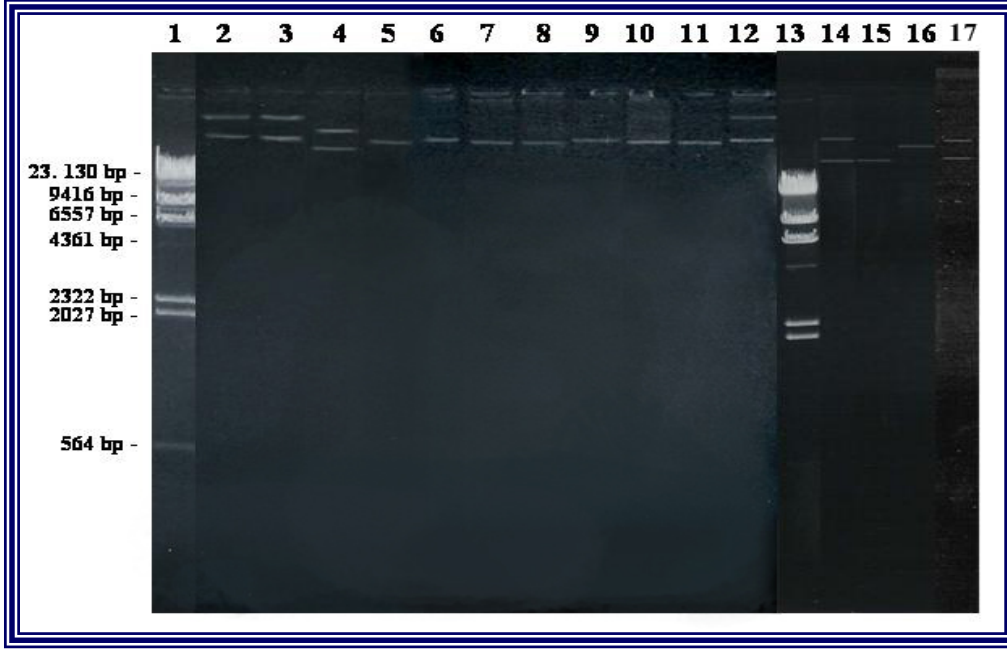
5.6. CTX-M Enziminin Aktarılabilirliği

5.6.1. Konjugasyon Deneyleri

*bla*_{CTX-M} geninin aktarılabilirliğinin incelenmesi amacıyla, streptomisine dirençli ve laktozu fermente etmeyen *E. coli* K12 suşunun (J62-2) kullanıldığı konjugasyon deneyleri gerçekleştirildi. 21 adet transkonjugant elde edildi.

5.6.2. Plazmid İzolasyonu

Enterobacteriaceae ailesine ait suşlarda beta-laktam direncinin büyüklüğü 46-85 kD arasında değişen plazmidler ile aktarıldığı belirlendi (Şekil 21). İncelenen suşlarda, PvuII ve Stu I restriksiyon enzimleri ile restriksiyon enzim analizinde başarı sağlanamadı .



1. λ hindIII Marker (23 bin bp)
2. Ege 35
3. K51
4. H25
5. H21
6. C40
7. TRE56
8. TKP 14
9. B5
10. C7
11. K44
12. H2
13. λ hindIII Marker (23 bin bp)
14. DE11859
15. 1111
16. C21
17. DE9224

Şekil 21 : Plazmid jel görüntüsü.

Tablo 12: İzolatlar ve plazmid içerikleri

İzolat/ Tc no.	Lab no	Tür	Merkez	Klinik izolatlar			Transkonjugantlar				
				pI**	blaCTX-M	Direnç fenotipi	CTX MIC (mg/L)	CTX/Ca MIC (mg/L)	Direnç fenotipi	Plazmid içeriği (kb)	P2T ile Bla genleri
1	TRE56	<i>E. coli</i>	Trabzon/KTU	6.4,7.6,8.2, 8.4,8.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZS, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTTr, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCS	41.5	CTX-M + TEM
2	111	<i>E. aerogenes</i>	Trabzon/KTU	5.4,8.2,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCr, FOXr, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTTr, TES, Cs, AKS CAZr, AMCS	43, 73	CTX-M + SHV
3	TKP14	<i>K. pneumoniae</i>	Trabzon/KTU	5.4,7.6,8.4 ,8.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZS, AMCr, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTTr, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCS	43	CTX-M
4	B5	<i>E. cloacae</i>	Bursa/UU	5.4,6.4,8.4, 8.6-8.8	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCI, FOXr, IPMS, GN1, AKr, SXTTr, CIPs, TeI, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTS, TES, Cs, AKS, CAZI, AMCS	43	CTX-M
5	B10	<i>E. coli</i>	Bursa/UU	5.4,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCr, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTTr, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCI	39, 49.5	CTX-M
6	B22	<i>K. pneumoniae</i>	Bursa/UU	5.4,7.6,8.2, 8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZI, AMCI, FOXI, IPMS, GNr, AKS, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTS, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCS		CTX-M
7	K38	<i>K. pneumoniae</i>	Kayseri/EU	7.6,8.2,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	Aktarım olmadı				
8	K44	<i>K. pneumoniae</i>	Kayseri/EU	5.4,7.6,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTS, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCI	43	CTX-M + SHV
9	K51	<i>E. coli</i>	Kayseri/EU	5.4,8.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCS, FOXS, IPMS, GNI, AKI, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTS, TeI, Cs, AKI, CAZS, AMCS	43, 75	CTX-M + TEM
10	H1	<i>E. coli</i>	Ankara/HU	7.6,8.2,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	Aktarım olmadı				
11	H2	<i>K. pneumoniae</i>	Ankara/HU	7.6,8.2,8.4, 8.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTS, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCS	43	CTX-M
12	H25	<i>E. coli</i>	Ankara/HU	5.4,7.1,7.6, 8.2,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZI, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTS, TeI, Cs, AKr, CAZI, AMCS	43	CTX-M +TEM
13	C21	<i>E. coli</i>	İstanbul/CAP	5.4,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCr, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKS, CAZS, AMCr	43	CTX-M
14	C40	<i>K. pneumoniae</i>	İstanbul/CAP	7.6,8.2,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTS, TES, Cs, AKS, CAZS, AMCI	40.5, 55	CTX-M +TEM
15	C7	<i>K. pneumoniae</i>	İstanbul/CAP	5.6,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKS, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKS, CAZr, AMCI	46.5	CTX-M + TEM
16	11589	<i>E. coli</i>	İzmir/DEU	5.4,7.6,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKS, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKr, CAZI, AMCI	46.5	CTX-M + TEM
17	9224	<i>K. pneumoniae</i>	İzmir/DEU	5.4,7.6,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	2	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKI, CAZS, AMCI	46.5	TEM
18	20769	<i>K. pneumoniae</i>	İzmir/DEU	8.4,8.6-8.8, 9.0	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZr, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	Aktarım olmadı				
19	Ege24	<i>K. oxytoca</i>	İzmir/EGE	5.4,7.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCI, FOXS, IPMS, GNr, AKr, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	Aktarım olmadı				
20	Ege44	<i>E. coli</i>	İzmir/EGE	8.4,8.6	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZs, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKI, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	128	<0.25	Ar, GNS, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKS, CAZI, AMCI	40	CTX-M
21	Ege35	<i>E. coli</i>	İzmir/EGE	5.4,7.6,8.4	CTX-M-3	Ar, CTXr, CAZI, AMCS, FOXS, IPMS, GNr, AKS, SXTTr, CIPs, Ter, Cr	> 256	<0.25	Ar, GNr, CIPs, SXTTr, TeI, Cr, AKS, CAZI, AMCI	40, 66	CTX-M + TEM

5.7. PZT Yöntemiyle CTX-M-1 dışındaki CTX-M grubu Enzimlerin Saptanması

İzolatların tümünün CTX-M-2, CTX-M-8 ve CTX-M-9 grubu açısından negatif olduğu belirlendi.

5.8. Dizi analizi ile seçilen ve *bla*_{CTX-M} Geni Taşıdığı Saptanan Suşların, Sefotaksim MİK Değerleri

Dizi analizi ve PZT ile *bla*_{CTX-m} geni taşıdığı saptanan suşların, sefotaksim MİK değerleri, CLSI önerilerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile saptandı. İncelenen 21 suştan 20'sinin sefotaksim MİK değeri 256 µg/ml'nin üzerinde, birinin 128 µg/ml'di. İzole edildikleri merkezlere göre sefotaksim MİK değerleri, Tablo 13'de yer almaktadır.

Tablo 13: Dizi analizi için seçilen suşların sefotaksim MİK değerleri

Merkez	İzolat	Sefotaksim MİK (mg/L)	Sefotaksim ve Klavulanik asit MİK (mg/L)
Karadeniz Teknik Üniversitesi	TRE56	> 256	<0.25
Karadeniz Teknik Üniversitesi	111	> 256	<0.25
Karadeniz Teknik Üniversitesi	TKP14	> 256	<0.25
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi	B5	> 256	<0.25
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi	B10	> 256	<0.25
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi	B22	> 256	<0.25
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi	K38	> 256	<0.25
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi	K44	> 256	<0.25
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi	K51	> 256	<0.25
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	H1	> 256	<0.25
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	H2	> 256	<0.25
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	H25	> 256	<0.25
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	C21	> 256	<0.25
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	C40	> 256	<0.25
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	C7	> 256	<0.25
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	11589	> 256	<0.25
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	9224	> 256	<0.25
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	20769	> 256	<0.25
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	Ege 35	> 256	<0.25
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	Ege 44	128	<0.25

5.9. DNA Dizi Analizi

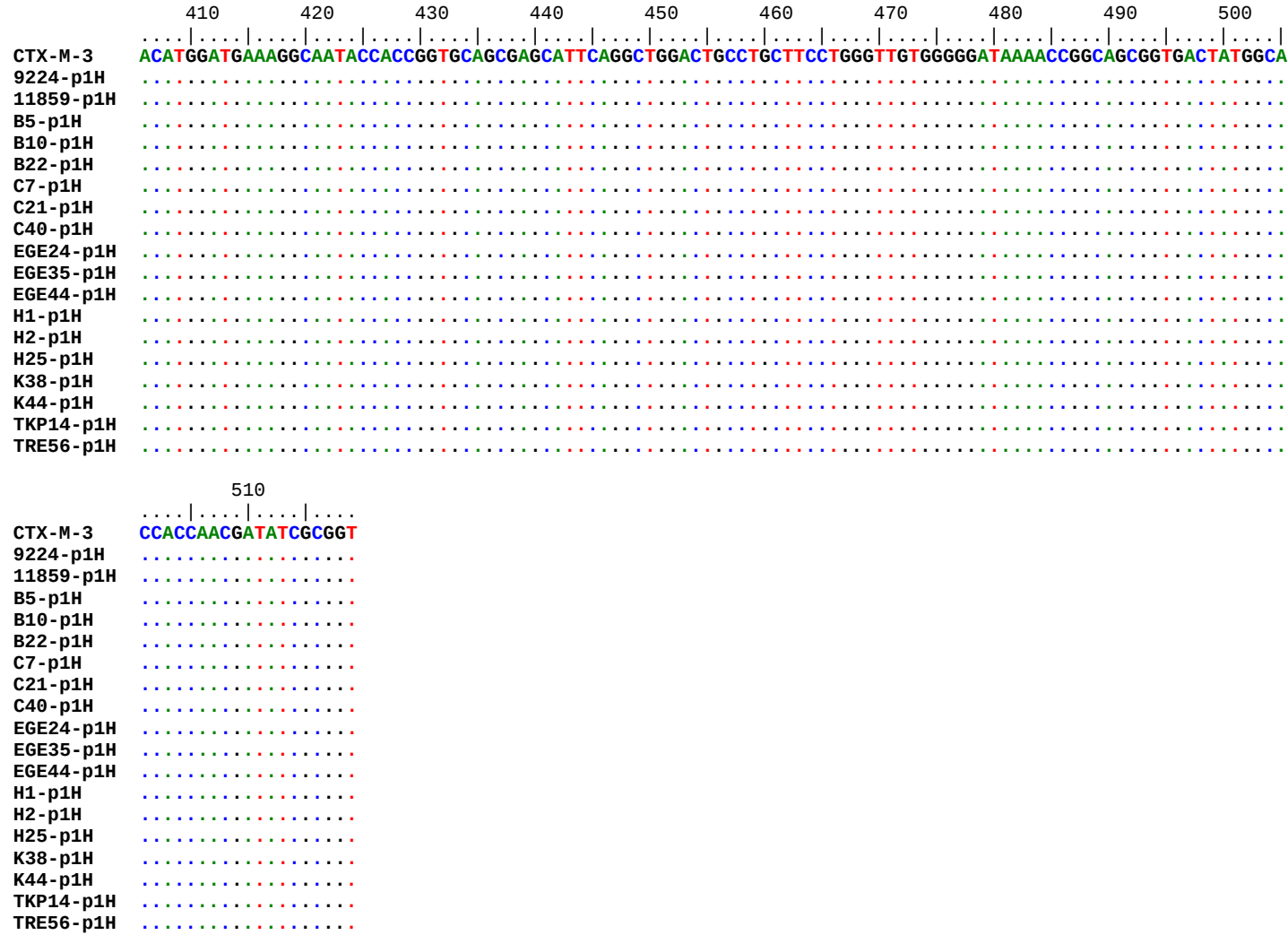
Tarama PZT ile CTX-M pozitifliği saptanan 53 tane izolatın 21'inde *bla*_{CTX-M} bölgesi dizi analizi ile amplifiye edildi ve çift yönlü dizi analizi kullanıldı. Sonuçların "Bioedit" programıyla yapılan hizalamasında (CTX-M-3 için Gen Bankası No:Y10278) bu dizilerin tümünün CTX-M-3 (Şekil 22) ile uyumlu olduğu belirlendi.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CTX-M-3	GGCCGCGGCCGCTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATT									
9224-p1H										
11859-p1H										
B5-p1H										
B10-p1H										
B22-p1H										
C7-p1H										
C21-p1H										
C40-p1H										
EGE24-p1H										
EGE35-p1H										
EGE44-p1H										
H1-p1H										
H2-p1H										
H25-p1H										
K38-p1H										
K44-p1H										
TKP14-p1H										
TRE56-p1H										

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CTX-M-3	GCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCAGG									
9224-p1H										
11859-p1H										
B5-p1H										
B10-p1H										
B22-p1H										
C7-p1H										
C21-p1H										
C40-p1H										
EGE24-p1H										
EGE35-p1H										
EGE44-p1H										
H1-p1H										
H2-p1H										
H25-p1H										
K38-p1H										
K44-p1H										
TKP14-p1H										
TRE56-p1H										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CTX-M-3	TTGGCGGCCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGG									
9224-p1H										
11859-p1H										
B5-p1H										
B10-p1H										
B22-p1H										
C7-p1H										
C21-p1H										
C40-p1H										
EGE24-p1H										
EGE35-p1H										
EGE44-p1H										
H1-p1H										
H2-p1H										
H25-p1H										
K38-p1H										
K44-p1H										
TKP14-p1H										
TRE56-p1H										

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
										
CTX-M-3	CGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTG									
9224-p1H										
11859-p1H										
B5-p1H										
B10-p1H										
B22-p1H										
C7-p1H										
C21-p1H										
C40-p1H										
EGE24-p1H										
EGE35-p1H										
EGE44-p1H										
H1-p1H										
H2-p1H										
H25-p1H										
K38-p1H										
K44-p1H										
TKP14-p1H										
TRE56-p1H										



Şekil-22: Çeşitli merkezlere ait suşların dizi analizi yapılan bölgesine ait protein dizisinin, “Bioedit” programı yardımıyla CTX-M -3 ile karşılaştırılması

6. TARTIŞMA

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler), başta *E.coli* ve *K.pneumoniae* olmak üzere çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktam direncine yol açmaktadır. GSBL'ler arasında son yıllarda büyük önem kazanan CTX-M grubu beta-laktamazlar, ilk kez 1986 yılında Matsumoto ve arkadaşlarının beta-laktam antibiyotiklerin farmakokinetik çalışmaları esnasında bir laboratuvar deney hayvanının dışkı florasında sefotaksime dirençli *E.coli* suşundan TEM veya SHV olmayan FEC-1 adını verdikleri bir beta-laktamaz saptamaları ile ortaya çıkmıştır (31). O dönemden bu yana günümüze dek 54 adet farklı CTX-M enzimi gösterilmiştir (24). Adlanlarından da anlaşıldığı gibi CTX-M grubu beta-laktamazlar sefotaksimi seftazidime göre daha çok parçalamaktadır; ancak son dönemde yapılan çalışmalarla 167. prolin rezidüsünde meydana gelen ve serin amino asidine dönüşmeyi sağlayan nokta mutasyonu ile bu enzimlerin seftazidimi de hidrolize ettiği gösterilmiştir (113).

Ülkemizde ve diğer birçok ülkede CTX-M yaygındır. Bu enzim grubu hastanede yatan hastalarda sık olduğu kadar toplum kökenli hastalarda da görülmektedir. Toplumda da görülme özelliği nedeni ile CTX-M diğer GSBL grubu enzimler arasında ayrı bir önem taşımaktadır. Değişik CTX-M grubu enzimlerin epidemiyolojik olarak farklı bir coğrafi dağılım gösterdiği görülmektedir. Fransa'da ilk CTX-M-3 üreten *Enterobacter cloacae* suşu 2000 yılında 56 yaşında diabetik bir hastanın idrar örneğinde saptanmıştır (122). Guibout ve arkadaşları (123) ise CTX-M-15 üreten aminoglikozid, kinolon ve tetrasiklinlere dirençli *E.coli* suşları saptamıştır.

Yunanistan'da iki yaşında bir kız çocuğunun idrar örneğinden izole edilen *E.coli* suşunda CTX-M-3 saptanması komşu ülkelerde de CTX-M-3 yayılımını işaret etmektedir (124). Güney Amerika ülkelerinden Brezilya'da Bonnet ve arkadaşları, çeşitli vücut sıvılarından üretilmiş 18 adet *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi klinik izolatta CTX-M-8 varlığını ortaya koymuştur (87). Öte yandan bir diğer Güney Amerika ülkesi olan Arjantin'den klinik örneklerde CTX-M-15, CTX-M-3 ve 2005 yılında da Japonya dışından ilk kez TOHO-1(CTX-M-44) bildirimi olmuştur (125, 126).

Britanya adasında Galler bölgesinde 1992-2003 yılları arasında izole edilen 106 insan kökenli *Salmonella* izolatının 14'ünde diğer Avrupa ülkelerine benzer şekilde CTX-M-1 ve CTX-M-9 varlığı gösterilmiştir (127). 2003 yılında ise İngiltere'de ilk kez CTX-M-3 enzimi;

45 yaşında nefrektomili bir kadın hastanın idrar örneğinde üreyen bir *E.coli* suşunda saptanmıştır (128). Bunlara ek olarak İngiltere’de CTX-M üreten izolatların dörtte birinin toplum kökenli örneklerden elde edilmesi ve bunların CTX-M-9 ve CTX-M-15 üretmesi dikkat çekicidir. Bu durum enzimin daha sıklıkla toplum kökenli olduğunu ortaya koymaktadır (129). Öte yandan İngiltere’de GSBL üreten *E.coli* izolatları giderek artan bir sorun oluşturmaktadır (130).

İngiltere, Kanada ve İspanya’da yapılan surveyans çalışmalarında toplum kökenli *E.coli* izolatlarında CTX-M üretimi ve bunun yanı sıra gentamisin, trimetoprim – sulfametaksazol, tetrasiklin ve siprofloksasine çoklu direnç bildirilmiştir (108-110). Bu durumun tedavi seçeneklerini çok azalttığı açıktır (111).

Bir diğer Avrupa ülkesi olan Almanya’da 11 laboratuvardan toplanan ve çeşitli vücut sıvılarından izole edilen *Enterobacter cloacae* suşlarında CTX-M-2, CTX-M-8 ve CTX-M-9 saptanmıştır (131).

Uzak Doğu ülkelerinden Japonya’ da CTX-M-14 ve CTXM-2, Tayvan’da ise CTX-M-3 saptanmıştır (132-135). İçinde ülkemizin de bulunduğu Doğu Avrupa ülkelerinden Polonya’da ise Baraniak ve arkadaşları tarafından (136) 2002’de Polonyalı bir hastadan ameliyat sonrası yara yerinden sefotaksime dirençli *E.coli* izolatından CTX-M-15 bildirilmiştir. Gniadkowski ve arkadaşlarının Polonya’da 5 yıllık süreçte gerçekleştirdikleri çalışmada, iki farklı eğitim hastanesinden toplanan izolatlarda CTX-M-3 saptanmıştır (137).

İsveç’te ise 2002 yılında meydana gelen bir hastane salgınından sorumlu etkenin GSBL üreten ve CTX-M pozitif bir *E.coli* suşu olduğu ortaya çıkarılmıştır (37). İtalya’da yapılan bir çalışmada ise bir yıl boyunca hastalardan izole edilen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi suşlarda CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-15 saptanmıştır (138).

2003 yılında ise Portekiz’de kan kültüründen izole edilen bir *K.pneumoniae* suşunda CTX-M-15 bulunmuştur ve bu Portekiz’den yapılan ilk bildirimdir (139). Buna ek olarak bir diğer çalışmada farklı bölgelerde yapılan surveyans çalışmalarında GSBL pozitif *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında CTX-M-15 üretimi yanı sıra kinolon ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerin etkisini modifiye eden enzim (qnr ve aminoglikozid için) varlığı gösterilmiştir (140).

İspanya’da yapılan bir başka çalışmada ise dört yıl boyunca hastanede yatan ve ayaktan tedavi olan hastalardan 30 adet CTX-M-9 pozitif *E.coli* izole edilmiştir. Barselona’daki bu

yayılım, aktarımın hem plazmid hem de diğer mobil elemanlarla (integronlarla) olduğunu düşündürmektedir (141). Bunun yanı sıra bir başka çalışmada toplum kökenli GSBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi suşlarda CTX-M-9 saptanmıştır. Aynı çalışmada 48 adet GSBL üreten ve poliklinik hastalarından izole edilen *E.coli* izolatının 28'inde CTX-M-14 (CTX-M-9 grubu) bulunmuştur (109,142). Ayrıca Mayorka'da 51 hastanın etkilendiği salgın esnasında çoklu ilaç direnci gösteren GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi bakterilerde CTX-M-1 ve karbapenem direnci gösterilmiştir (143). Bunun yanı sıra İspanya'da Valverde ve arkadaşları (106) salgın olmayan durumlarda bile hastanede yatan hastaların dışkı örneklerinde artan oranlarda GSBL varlığını göstermiştir.

Tel-Aviv /İsrail'de de *Enterobacteriaceae* izolatlarında GSBL oranları oldukça yüksektir ve bu bölge de TEM, SHV ve CTX-M pozitiflikleri saptanmıştır (145). Tel-Aviv'de yapılan bir başka çalışmada 80 adet *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi kan izolatının 15 tanesi toplum kökenli olup CTX-M-2 üretmektedir (146).

Plazmid kökenli CTX-M-3 yayılımı yanı sıra çalışmalar, özellikle Rusya, Macaristan ve Yunanistan'da spesifik bir klonun yayıldığını düşündürmektedir (147).

Pournaras ve arkadaşları Yunanistan'da üçüncü basamak bir merkezde yatan hasta ve poliklinik hastalarından izole edilen *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaptıkları bir çalışmada CTX-M-1 ve CTX-M-3 saptamışlardır (148).

İtalya'da Brigante ve arkadaşlarının (149) 5 yıllık dönemde Kuzey İtalya'da hastanede yatan ve poliklinikten gelen hastalardaki çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarında yaptıkları çalışmada CTX-M-1 bulunmuş ve bu durum oksiiiminocefalosporin kullanımının yaygınlığına bağlanmıştır. Bu bölgede yapılan bir başka çalışmada 11 merkezin katılımı ile *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde CTX-M-1, CTX-M-15 ve CTX-M-32 saptanmış olup yayılım dikkat çekicidir (150).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez CTX-M benzeri GSBL varlığı beş farklı eyaletten toplanan dokuz adet *E.coli* suşunda saptanmış olup bunların CTX-M-14 olduğu ortaya konmuştur (81).

Hindistan'da ilk CTX-M üretimi ilk kez Yeni Delhi'de 2000 yılında birbiri ile ilişkili olmayan altı adet *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriden CTX-M-15 saptanması ile ortaya konmuştur (151). Öte yandan Afrika ülkelerinden de CTX-M bildirimi mevcuttur (152).

Latin Amerika ülkelerinden Peru ve Bolivya’da Ağustos – Kasım 2002 arasındaki dönemde 3208 sağlıklı çocukta yapılan fekal *E.coli* izolatlarının taranması ile dört adet oksiminio sefalosporinlere ve aztreonama dirençli suşta CTX-M-15 saptanmış olup böylelikle bu bölgede ilk kez CTX-M-15 bildirilmiştir. Bu çalışmada, florada bulunan *E.coli* suşlarının direnç aktarımında önemli bir rezervuar olabileceği gösterilmiştir (153).

Lübnan’da GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin hastane ve toplum kökenli yayılımını araştırmak amacı ile ülkenin farklı bölgesindeki altı hastanede yatan 1442 hasta ve 58 hastane çalışanından fekal örnek toplanmıştır. Yetmişiki hastadan, 118 GSBL pozitif izolat elde edilmiştir. Aralarında herhangi bir klonal yakınlık saptanmamıştır ve büyük çoğunluğu CTX-M-15 üretmektedir (154).

Bugün 50’den fazla varyantı olan CTX-M grubu GSBL’ler TEM ve SHV grubu enzimlerin aksine hastane kökenli yayılımın aksine toplumdan ve hatta sağlıklı hayvanlardan köken alan suşlarda saptanmaktadır. Danimarka’da hayvancılık alanında infeksiyon kontrolü ve önlenmesinde en sık kullanılan antibiyotik grubu beta-laktamlardır (155). Bu durum giderek beta-laktam direncini arttırmakta ve hayvanların da birer rezarvuvar olduğunu düşündürmektedir. Hayvan kökenli izolatlardan saptanan CTX-M grubu enzimlerin fazla miktarda sefalosporin kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (155).

Ülkemizde beta-laktam direnç prevalansını ve enzim tiplerini araştıran çeşitli çalışmalar CTX-M grubu GSBL’lerin ülkemizde de giderek yaygınlaştığını göstermektedir ancak bu konuda bölgelere göre kesin bir veri bulunmamaktadır.

Dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların sağaltımında çoğunlukla geniş spektrumlu beta-laktam ajanlar tek başına veya aminoglikozidler ve florokinolonlar ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanımlarına paralel olarak direnç gelişimi de sıktır. Ülkemizde hastane kökenli Gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotik gruplarına duyarlılıklarını inceleyen çok merkezli çalışmalarda üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ile florokinolonlara direncin önemli boyutlara ulaştığı görülmektedir (38). Hitit çalışmasında *E.coli* izolatlarında GSBL oranı çeşitli merkezlerde %15.5 ile %37.3 arasında değişmektedir. Bu oran, *K.pneumoniae* izolatlarında ise %20.3- %43.8’dir. Yayınlanan diğer makalelere bakıldığında da; 2003-2004 yılına ait çeşitli çalışmalarda *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında değişen oranlarda GSBL üretiminin mevcut olduğu görülmektedir. 2003’te Ankara’dan Karavelioğlu ve arkadaşlarının (156)

çalışmasında hastane kökenli *E.coli* izolatlarında GSBL oranı %26 iken, *K.pneumoniae*'da %38.9 bulunmuştur. Aynı çalışmada toplum kökenli izolatlarda GSBL pozitif *E.coli* oranı %2 ve *K.pneumoniae* için %4.6'dır. İzmir'den Doğan ve arkadaşlarının(155) 2002-2003 yıllarını kapsayan çalışmalarında ise hastane kökenli 114 *E.coli* izolatında GSBL oranı %9.6 iken; *K.pneumoniae* içinse bu oran %47.3 bulunmuştur. Aynı araştırmacılar 2003-2004 arası dönemde hastane kökenli GSBL üreten *E.coli*'lerde GSBL üretim oranı %26.9; *K.pneumoniae* içinse bu oran %34.7 olarak bildirmişlerdir. Dolayısıyla *E.coli* izolatlarındaki oran yükselirken *K.pneumoniae* izolatlarındaki oran düşmüştür. 2005 yılında Armed-EARSS Akdeniz bölgesi için *E.coli* 3.kuşak sefalosporin oranı %30.9 olarak bildirilmiştir (144). Antalya'dan Gültekin ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bir başka çalışmada toplum kökenli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatların da GSBL oranları %13.5 ve %26 olarak saptanmıştır. Bayraktar ve arkadaşları (156), 2003-2004 yıllarında toplum kökenli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında %8 ve %36 oranında GSBL saptamışlardır. Açıkgöz ve arkadaşları Ankara'da 2001-2004 yılları arasında ise toplum kökenli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında %6.7 ve %14.3 oranında GSBL saptamışlardır. Öte yandan Mumcuoğlu ve arkadaşları 2001-2003 yıllarında yaptıkları çalışmada, toplum kökenli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında %20 ve %44 oranında GSBL saptamışlardır. Bu veriler ışığında hastane ve toplum kökenli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında yıllar içinde giderek artan GSBL saptandığı görülmektedir. Burada bir diğer önemli konu toplum kökenli izolatlarda da GSBL oranlarının yükselmesidir (156).

Hastanemizde 1 Mayıs 2002- 31 Aralık 2005 tarihleri arasında Klinik Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden soyutlanan *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL pozitiflik oranı Mayıs 2002-Nisan 2003 döneminde %3 iken, ikinci yıl %9 ve üçüncü yıl %14'e çıkmıştır. Aynı çalışmada özellikle *E.coli* ve *Enterobacter spp.* izolatlarında GSBL üretiminde artış gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda poliklinik kökenli izolatlarda GSBL gözlenmezken Mayıs 2002-Aralık 2005 döneminde toplum kökenli suşlarda yıllar içinde giderek artan biçimde %4-7.4 oranında GSBL pozitifliği saptanmıştır (10). 2006 yılının ilk 10 aylık döneminde yapılan bir başka çalışmada ise bu oranın %11'e yükseldiği belirlenmiştir. Dolayısıyla toplum kökenli izolatların GSBL üretim oranlarında belirgin bir artış gözlenmektedir.

CTX-M grubu enzimler ülkemizde ilk kez Ağustos 2001'de 7 yaşındaki çocuk hastadan izole edilen *S.sonnei* suşunda CTX-M-3 enziminin saptanması ile bildirilmiştir. (15,107).

Bunu izleyen yıllarda bildirimlerin giderek arttığı gözlenmektedir. Örneğin merkezimizde yapılan bir çalışmada 2001 – 2002 yıllarına ait 14 adet GSBL pozitif klinik *E.coli* izolatında CTX-M-3 saptanmıştır (16). Ayhan ve arkadaşlarının 2002-2004 yıllarında Behçet Uz Çocuk Hastanesi’nde meydana gelen 7 farklı hastane salgınında izole ettikleri 81 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium suşunun merkezimizde yapılan moleküler çalışmalarında SHV-12 ve CTX-M-3 ürettiği belirlenmiştir (17,18).

2005 yılında ise Gür ve arkadaşlarının yaptığı Hitit çalışmasında merkezimizde %79 oranında *bla*_{CTX-M} pozitifliği saptanmıştır. Çalışmada incelenen izolatlarda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde bu oran %60, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi’nde %57, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde %70, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde %75 ve İbni Sina Hastanesi’nde ise %72 olarak belirlenmiştir (38). Bizim çalışmamızda da farklı merkezlerde *bla*_{CTX-M} varlığının %50-100 arasında değiştiği görülmektedir.

2001 yılında, İstanbul’da izole edilen bir *K.pneumoniae* suşunda yine CTX-M-3 gibi CTX-M-1 ailesinden başka bir enzim olan CTX-M-15 enzim bildirilmiştir (157). Aktaş ve arkadaşları (19) ise İstanbul’da izole edilen bir *E.coli* suşunda CTX-M-3 gibi CTX-M-1 ailesinden bir enzim olan CTX-M-15 varlığını göstermişlerdir.

Bu noktada tek tek olgu sunumları olmasına rağmen farklı coğrafik bölgelere ilişkin verilerin kısıtlı olması nedeniyle; çalışmamızda Kasım 2002- Temmuz 2003 arasında ülkemizdeki 7 farklı merkezden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler arasında CTX-M prevalansı, bundan sorumlu genetik elemanların özellikleri, CTX-M üreten suşların klonal yakınlıkları araştırılmıştır.

Çalışmamızda sefotaksim (CTX) direncinin yanı sıra sefpodoksim (CPD), seftazidim (CAZ), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), sefepim (FEP), amoksisilin- klavulanik asit (AMC) ve sefoksitin (FOX) antibiyotiklerine direnç ve GSBL üretimi gibi özellikler de incelenmiştir. Genel olarak, sefotaksim dirençli *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K. ornitholytica*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* ve *S.sonnei* suşlarının diğer beta-laktam antibiyotiklere de büyük oranda dirençli olduğu, incelenen ajanlar içinde en etkilisinin imipenem olduğu belirlenmiştir. Seçilen suşların tamamına yakını GSBL pozitif olup bazı suşlarda direncin kromozomal AmpC üretimine bağlı olabileceği belirlenmiştir.

Aralarında merkezimizin de bulunduğu Türkiye ‘deki yedi farklı merkezden toplanan 70 adet suşta CTX-M PZT ile %75.7 oranında pozitiflik saptanmıştır. Çalışmaya alınan merkezlerden Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde %100, Ege Üniversitesi Tıp

Fakültesi'nde %70, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde %80, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %80, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %90, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %50 ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %60 oranında CTX-M pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızda *blaCTX-M* oranı *K.pneumoniae* izolatları için %83.3, *E.coli* izolatlarında ise %77.4 bulunmuştur. Seçilen izolatlarda yapılan dizi analizi çalışmaları ile bu izolatlarda bulunan CTX-M-3 olduğu gösterilmiştir. Böylelikle ülkemizin de aralarında bulunduğu Doğu Avrupa'da CTX-M-3 yaygınlığı çalışmamızda da gösterilmiştir (158).

ERIC-PZT yöntemiyle yapılan klonal yayılım çalışmasında merkezler içerisinde küçük kümelenmeler olmasına karşın merkezler arasında herhangi bir klonal yayılım saptanmamıştır. Bu bulgular bir salgını düşündürmemektedir. Farklı merkezlerden toplanan izolatların rastgele seçilmesi bu duruma sebep olabilir. Ancak CTX-M üretim oranlarındaki artış hareketli bir elemanın yayılımını düşündürmektedir.

Öte yandan transkonjugasyon ve plazmid ekstraksiyon çalışmaları ile *bla CTX-M* 'in 46 -85 kbp arası büyüklüklerdeki plazmidlerle geçtiği ortaya konmuştur. Bu da farklı çalışmalarda gösterildiği gibi yayılımın plazmid aracılığı olduğunu göstermektedir (54). Ancak çalışmamızın bir kısıtlılığı plazmid restriksiyon enzim analizinin gerçekleştirilememesi; dolayısıyla benzer büyüklükteki plazmidlerin aynı olup olmadığının değerlendirilememesidir.

Hastane içinde GSBL yayılımını engellemek için önerilen çeşitli infeksiyon kontrol yöntemleri mevcuttur (159). Bunlar arasında izolasyon önlemleri, çevresel dekontaminasyon ve antibiyotik kullanım paternlerinde değişiklik sayılabilir. Klinikte yapılan pek çok çalışmada hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımının kısıtlanmasının GSBL üreten bakteri infeksiyonlarında azalmaya ve salgınların kontrol altına alınmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6). Benzer şekilde yaygın beta-laktam dışı geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile GSBL sentezleyen bakteri salgınları arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur.

GSBL üreten Gram negatif bakteri infeksiyonları önemli sorunlara yol açmaktadır. Her geçen gün sayıları artan beta-laktamazlar aslında bakterilerin değişen çevre koşullarına uyum için kullandıkları bir tür savunma aracı olarak düşünülebilir. Bu tür bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarla mücadelede antibiyotik kullanım ilkelerine uyulmalı ve hastane infeksiyon kontrol önlemlerine dikkat edilmelidir.

CTX-M enziminin saptanmaması ya da geç saptanması tedavi başarısızlıklarına yol açmaktadır. CTX-M üreten suşların toplumda artışı dikkat çekicidir. Bu durum sadece geniş spektrumlu sefalosporinlerin yoğun kullanımı ve seçici baskısına bağlanmamalıdır. Evrimsel süreçte moleküler düzeyde *bla_{CTX-M}* geninin rekombinasyonel olarak IS veya transpozon gibi elemanlarla aktarımı söz konusudur. Plazmidle olan aktarımda farklı çevrelere yayılım önemlidir (14).

bla_{CTX-M} genleri doğal olarak Kluyvera cinsi bakterilerde bulunmaktadır. Bu enzimin hastanelere olan yayılımının toplumdan geçişle meydana geldiği tahmin edilmektedir ve bu sürecin, toplumdan hastaneye ve hastaneden topluma geçişlerin bir döngü halinde devam ettiği düşünülmektedir (12,14,55-59).

CTX – M grubu enzimler hem toplum hem de hastane kökenli suşlarda yayılmaya devam etmektedir. Bu artış sadece geniş spektrumlu sefalosporinlerin yaygın kullanımına bağlı seçici baskıya dayandırılmamalıdır. Burada moleküler düzeyde hareketli genetik elemanlarla gelişen evrim de önemlidir. İleri dönemde buna yönelik çalışmalarla CTX-M pandemisi daha iyi anlaşılmalı çalışılmalıdır (14,53).

CTX-M enziminin yayılımı spesifik klonlar ile değil de, çok sayıda klon ve hareketli genetik elemanlar aracılığı ile gerçekleşmektedir (14). Plazmid kökenli olan CTX-M enzimlerinin, aynı plazmid üzerinde ISEcp1 olarak adlandırılan bir IS elemanı varlığında yayılım hızının arttığı bildirilmektedir (112). CTX-M üreten bakterilerle hastane infeksiyonlarında artış görülmesinin nedeni, diğer GSBL'lerin aksine toplum kökenli enzimlerin hastane ortamına geçmesidir (14).

7.SONUÇ :

Sonuç olarak çalışmamızda yedi farklı merkezden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyesi suşlarda TEM veya SHV grubu olmayan GSBL grubu bir enzim olan CTX-M grubu GSBL'lerin moleküler epidemiyolojisi araştırılmıştır. Türkiye'deki diğer merkezlerin de bu çalışmalara katılması ile bu enzimin yayılımı konusunda bilgilerimiz artacaktır. Ancak özellikle enzimin toplumdaki ve hastanedeki rezervuarları konusunda ileri çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-951.
2. Öncül O. Hastane kökenli Gram-negatif çomaklarda direnç. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p94, 19-23 Eylül, 2004, Kuşadası, Aydın, Türkiye.
3. Turner PJ. Extended – Spectrum β - Lactamases. Clinical Infectious Diseases 2005; 41: 273-5.
4. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev Oct 1995; p.557-584.
5. Dolapçı İ. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar: Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tedavi ve Enfeksiyon Kontrolündeki Roller. Mikrobiyoloji Bülteni 2005, 39: 229-240.
6. Paterson DL, Bonomo RA. Extended Spectrum Beta-Lactamases: Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4):657-686.
7. Albertini MT, Benoit C, Berardi L, Berrouane Y ve ark. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicenter incidence study. J Hosp Infect 2002 ; 52 : 107-113.
8. Borg MA, Scicluna E, de Kraker M, van de Sande-Bruinsma N ve ark. Antibiotic resistance in the Southeastern Mediterranean-Preliminary results from the Armed Project. Euro Surveill. 2006; 11(7):164-167.
9. Colodner R. Extended-spectrum beta-lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. The Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology 2005; 33: 104-107.
10. Terek G, Gülay Z. *Enterobacteriaceae* üyelerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz üretimi: Üç yıllık veriler. Antimikrobia Kemoterapi Günleri İstanbul 2006.

11. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell. Mol. Life Sci. 2004 61: 2200-2223.
12. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis. 2006; 15;42 Suppl 4:S153-63.
13. Livermore DM, Canton R, Gniawdkowski M, Nordmann P ve ark. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007 Feb;59(2):165-174.
14. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta -lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(5):466-475.
15. Açıkgöz ZC, Gülay Z, Biçmen M, Gocer S ark. CTX-M-3 Extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. Scand J Infect Dis 2003; 35: 503-505.
16. Gülay Z, Atay T, Biçmen M. Cefotaximase – M type beta – lactamase production in *Escherichia coli* isolated at a university hospital in Turkey. 13th European Clinical Microbiology and Infectious Diseases 10-13 May 2003. Glasgow, UK. Poster 1564.
17. Ayhan FY, Agın H, Erac B, Gulfidan G ve ark. The evaluation of clusters of hospital infections due to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the neonatal clinic of a children's hospital: A two years period of experience. IFIC 2005. Poster presentation.
18. AyhanY, Gülay Z, Biçmen M, Gülfidan G ve ark. Outbreak due to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium producing SHV-12 and CTX-M-3 extended – spectrum beta-lactamases (ESBLs) at a children's hospital. Microbiologia Balkanica 2003. Poster number: P-356.
19. Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal C ve ark. 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 (4): 421-429.
20. Gülay Z. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. Toraks Dergisi, Nisan 2002,Cilt 3 Sayı 1.

21. Demirtürk N, Demirdalı T. Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Kocatepe Tıp Dergisi 5: 17- 21 Mayıs 2004.
22. Paterson D. Extended spectrum beta-lactamases: the European experience. Curr Opin Infect Dis 2001; 14: 697-701.
23. Bush K. New Beta-lactamases in Gram negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32: 1085-1089.
24. www.lahey.org/webt.htm
25. Bush K. The evolution of beta-lactamases. Mikrobiyoloji Bülteni (Birinci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Özel Sayısı) Ocak-Nisan 2000.
26. Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 281-294.
27. Bauernfeind A, Stemplinger I., Jungwirth R, Mangold P ve ark. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:616–620.
28. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-pectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with Class A beta- lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Jan;38(1):104-114.
29. Brown S, Amyes SG. OXA (beta)-lactamases in Acinetobacter: the story so far. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(1):1-3.
30. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2006 Mar;57(3):373-383.
31. Bonnet R. Growing group of extended–spectrum beta-lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1):1-14.

32. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal D ve ark.. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240--Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2269-2275.
33. Bonnet R, Sampaio JL.,Chanal C., Sirot D ve ark. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(11):3061-3068.
34. Giakkoupi P, Tzouveleakis L S, Tsakris A ve ark. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2247–2253.
35. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plazmid mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:307–313.
36. Kliebe C,. Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM ve ark. Evolution of plazmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*1985; 28:302–307.
37. Fang H, Lundberg C, Olsson-Liljequist B, Hedin G ve ark. Molecular epidemiological analysis of *Escherchia coli* isolates producing extended- spectrum beta–lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42(12):5917-5920.
38. Gür D. Hitit Projesi 2005.
39. Thomson K.S. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr;7(2):333-336.
40. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, editors. *Manuel of clinical microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 1076-1102.
41. Scheffers DJ, Pinho M. G. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69(4):585-607.

42. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers, 1997; 785-856.
43. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. Jawetz, Melnick, Adlberg's Medical Microbiology. Twenty-second edition. USA: Appleton&Lange, 2001; p. 7- 37.
44. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms Clin Microbiol Infect 2001; 7: 597–608.
45. Koch AL. Bacterial cell wall as target for attack: Past, Present, and Future Research. Clin Microbiol Rev 2003; 16(4):673-87.
46. Thomson JM. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril. Curr Opin Microbiol. 2005; 8: 518–524.
47. Gür D. Gram-negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. 2004 Bilimsel Tıp Yayınevi sf: 69-74.
48. Gootz TD. The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. Biochem Pharmacol. 2006; 71(7):1073-1084.
49. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
50. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Dec;39(12):2593-601.
51. Bonomo RA, Rudin SD, Shlaes DM. Tazobactam is a potent inhibitor of select class A inhibitor-resistant enzymes. FEMS Microbiol. Lett. 1997; 148: 59-62.

52. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE ve ark. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(3):665-668.
53. Abdalhamid B, Pitout JD, Moland ES, Hanson ND. Community – onset disease caused by *Citrobacter freundii* producing a novel CTX-M beta-lactamase, CTX-M-30, in Canada. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(11):4435-4437.
54. Kim J, Lim Y M. Prevalance of depressed AmpC mutants and extended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, and *Serratia marcescens* in Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM- 52 and SHV-12. J Clin Microbiol. 2005; 43(5):2452-2455.
55. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P ve ark. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, Probable Progenitors of Some Plazmid-Encoded CTX-M Types. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(9):3045-3049.
56. Welsh KJ, Barlow M, Tenover FC, Biddle JW. Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended spectrum beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(3):1242-1244.
57. Esen Ş. ESBL 'lerin epidemiyolojik özellikleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL). 2004 Bilimsel Tıp Yayınevi sf. 26-30.
58. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterizarition of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3595-3598.
59. Poirel, L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:4038–4040.

60. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R ve ark. Clinical importance of extended spectrum beta-lactamase (PER-1-type)- producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol. 2001; 50(7):642-645.
61. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Feb;41(2):223-232.
62. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C ve ark. GES-2, a class A beta-lactamase from *P.aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:2598-2603.
63. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, ve ark. Novel carbapenem hydrolyzing beta-lactamase , KPC-1, from a carbapenem resistant strain of *K.pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother 2001; 45:1151-1161.
64. Walsh TR.,Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(2):306-325.
65. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 210-229.
66. Helfand MS, Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. Curr Opin Pharmacol. 2005; 5(5):452-458.
67. Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar. Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004 sf. 95-110.
68. Murray P. R., Rosenthal K. S.,Kobayashi G. S.,Pfaller M. Medical Microbiology 4th ed. Mosby Publishing Company 2002 p. 35-47.
69. Tenover FC, Schaberg DR. Molecular biology of resistance. In: Bennett JV, Brachman PS, editors. Hospital infections. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 237-247.

70. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, Gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999 18: 761-770.
71. Babic M., Hujer A. M., Bonomo R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006 Jun;9(3):142-156.
72. Normark B.H., Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 2002; 252: 91-106.
73. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F ve ark. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*. 1987; 2(8554):302-306.
74. Lucet JC, Decre D, Fichelle A, Joly-Guillou ML ve ark. Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1411–1418.
75. Sekowska A, Janicka G, Klyszejko C, Wojda M ve ark. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Med. Sci. Monit*. 2002; 8:BR100-104.
76. Babini SG, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Feb;45(2):183-189.
77. Livermore D M, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella spp.* from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:409–424.
78. Jacoby GA, Medeiros AA , O'Brien T F, Pinto ME ve ark. Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases. *N. Engl. J. Med*. 1988; 319:723–724.
79. Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R ve ark. Novel plazmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in

clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1989 ;33(9):1451-1456.

80. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A ve ark. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plazmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Oct;48(10):3758-3764.
81. Moland ES, Black JA, Hossain A, Hanson ND ve ark. Discovery of CTX-M-like extended-spectrum –beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from five U. S. States Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7):2382-2383.
82. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM ve ark. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2001; 39(6):2206-2212.
83. Neuwirth C, Madec S, Siebor E, Pechinot A ve ark. TEM-89 beta-lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(12):3591-3954.
84. National Nosocomial Infections Surveillance. 2002. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. Am. J. Infect. Control 30:458–475.
85. Casellas, JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. Infection 1989; 17:434–436.
86. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early Dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(2):602-604.
87. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C ve ark. A novel CTX-M beta–lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(7):1936-42.

88. Poirel L, Thomas I, Naas T, Karim A ve ark. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3):622-632.
89. Cotton MF, Wasserman E, Pieper CH, Theron DC ve ark. Invasive disease due to extended spectrum beta-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. J Hosp Infect. 2000; 44(1):13-17.
90. Karas JA, Pillay DG, Muckart D, Sturm AW .Treatment failure due to extended spectrum beta-lactamase. J Antimicrob Chemother. 1996; 37(1):203-204.
91. Bell JM, Turnidgea JD, Galesb AC, Pfaller MA, Jones RN, the SENTRY APAC Study Groupe. Prevalence of extended spectrum beta -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998 –99). Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 42(3):193-198.
92. Mulgrave, L, Attwood PV. Characterization of an SHV-5 related extended broad-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* from Western Australia. Pathology 1993; 25:71–75.
93. Du B, Long Y, Liu H, Chen D ve ark. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. Intensive Care Med 2002 28:1718–1723.
94. Yamaguchi K, Mathai D, Biedenbach DJ, Lewis MT ve ark. Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against over 2,000 clinical isolates from 22 Medical Centers in Japan. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34:123–134.
95. Lewis, MT, Yamaguchi K, Biedenbach DJ, Jones RN. In vitro evaluation of cefepime and other broad-spectrum beta-lactams in 22 medical centers in Japan: a phase II trial comparing two annual organism samples. The Japan Antimicrobial Resistance Study Group. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 35:307–315.

96. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y ve ark. Novel plazmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1243– 1246.
97. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plazmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294-298.
98. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M ve ark. A new plazmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992; 20:158–163.
99. Bernard H, Tancre`de C, Livrelli V, Morand A ve ark. A novel plazmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:590–592.
100. Barthél my M, P duzzi J, Bernard H, Tancre de C ve ark. Close amino acid sequence relationship between the new plazmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1122(1):15-22.
101. Ishii, Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S ve ark. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39: 2269–2275.
102. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S ve ark. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:509–513.
103. Gniadowski M, Schneider I, Paucha A, Jungwirth R ve ark. Cefotaxime resitant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 827- 832.

104. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(1):52-59.
105. Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M ve ark. Mechanisms of resistance to expanded cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1107-1110.
106. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A ve ark. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol. 2004 ; 42(10):4769-4775.
107. Açıkgöz ZC, Gülay Z, Göçer S, Bicmen M ve ark. CTX-M type extended spectrum beta-lactamase in a clinical *S. sonnei* isolate. 2nd. Molecular and Diagnostic Microbiology Congress April 21-25,2002. Merit Limra Hotel Antalya, Turkey. Poster Number: 2-05.
108. Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M ve ark. Predominance and genetic diversity of community- and hospital acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(3):628-633.
109. Rodríguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L ve ark. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 2004; 42(3):1089-1094.
110. Pitout JD, Gregson DB, Church D L, Elsayed S ve ark. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2844-2849.
111. Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML ve ark. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(11):4667-4670.

112. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla* CTX-M genes. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(1):14-23.
113. Kimura S, Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K. Predictive analysis of ceftazidime hydrolysis in CTX-M-type-beta-lactamase family members with a mutational substitution at position 167. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29(3):326-331.
114. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (eski-NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement, NCCLS document M100-S14. Wayne, Pennsylvania, USA 2004; 30-104.
- 114a. Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (eski-NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement, CLSI document M100-S16. Wayne, Pennsylvania, USA 2006; 32-38.
115. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH ve ark. Dissemination of transferable CTX-M type extended – spectrum beta-lactamases-producing Escherichia coli in Korea. J Appl Microbiol .2005; 98(4):921-927.
116. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acid Res 1991; 19: 6823-6831.
117. Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method and comparison with the E test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 398-402.
118. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 332-370.
119. Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Muller F-MC. Molecular typing for fungi a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 172–185.

120. Matthew M, Harris AM, Marshall JM, Ross GW. The use of analytic isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-78.
121. Amyes SG, Gould IM. Trimethoprim resistance plasmids. *Ann Microbiol (Paris)*. 1984; 135B: 177-86.
122. Doucet-Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3 producing *Enterobacter cloacae* in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 ;44(11):3239-3240.
123. Leflon- Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F ve ark. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15–producing *Escherchia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French Geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(10):3736-3742.
124. Pournaras S, Tsakris A, Ikonomidis A, Markogiannakis A ve ark. Detection of a novel variant bla(CTX-M-3) extended spectrum beta–lactamase gene in a community – acquired *Escherchia coli* isolate. *Scand J Infect Dis*. 2006; 38(3):213-216.
125. Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J ve ark. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(5):397-402.
126. Andres P, Petroni A, Faccone D, Pasterán F ve ark. Extended – spectrum beta – lactamases in *Shigella flexneri* from Argentina: first report of TOHO-1 outside Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25(6):501-507.
127. Batchelor M., Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA ve ark. bla CTX-M Genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from Humans in England and Wales from 1992-2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4):1319-1322.
128. Winstanley TG, Ridgway EJ, Parys BT, Woodford N ve ark. First isolation of a CTX-M-3 beta–lactamase producer in the United Kingdom. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24(6):625-627.

129. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J ve ark. Community and hospital spread of *Escherchia coli* producing CTX-M extended – spectrum beta-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004 ;54(4):735-743.
130. McMullan R, Loughrey AC, McCalmont M, Rooney PJ. Clinico-epidemiological features of infection caused by CTX-M type extended spectrum beta-lactamase producing *E.coli* in hospitalized patients. J Infect. 2007; 54(1):46-52.
131. Hoffmann H, Stürenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended – spectrum beta – lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 322- 330.
132. Yu W L, Winokur PL, Von Stein DL, Pfaller MA ve ark. First description of *Klebsiella pneumoniae* harboring CTX-M beta-lactamases (CTX-M-14 and CTX-M-3) in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1098-1100.
133. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM ve ark. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta – lactamases among clinical isolates of *Escherchia coli* in southern Taiwan. J Clin Microbiol. 2000; 38(12):4320-4325.
134. Ma L, Ishii Y, Chang FY, Yamaguchi K ve ark. CTX-M-14, a plazmid –mediated CTX-M type extended- spectrum beta– lactamase isolated from *Escherchia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6):1985-1988.
135. 135. Muta T, Tsuruta N, Seki Y, Ota R ve ark. A nosocomial outbreak due to novel CTX-M- 2 producing strain of *Citrobacter koseri* in a hematological ward. Jpn. J. Infect.Dis 2006; 59(1):69-71.
136. Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P ve ark. Ceftazidime – hydrolysing CTX-M-15 extended- spectrum beta – lactamase (ESBL) in Poland. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(3):393-396.
137. Naumiuk L, Baraniak A, Gniadkowski M, Krawczyk B ve ark. Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdańsk, Poland, over a 5-year period. J Clin Microbiol. 2004; 42(7):3108-3116.

138. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM ve ark. Multiple CTX-M type extended- spectrum beta – lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. J Clin Microbiol. 2003; 41(9):4264-4269.
139. Conceição T, Brízio A, Duarte A, Lito LM ve ark. First description of CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(1):477-478.
140. Machado E, Coque TM, Canton R, Baquero F ve ark. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9):3220-3221.
141. García A, Navarro F, Miró E, Mirelis B ve ark. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. J Antimicrob Chemother. 2005 ;56(5):819-826.
142. Velasco C, Romero L, Martinez JM, Rodriguez-Bano J ve ark. Analysis of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalised patients in Seville. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29(1):89-92.
143. Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo O ve ark. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. J Clin Microbiol. 2006; 44(8):2831-2837.
144. <http://www.rivm.nl/earss/armed/>
145. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O ve ark. Extended – Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacter* Isolates obtained in Tel Aviv, Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Mar;49(3):1150-1156.
146. Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D ve ark. Influx of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. Clin Infect Dis. 2006; 42(7): 925-934.

147. Witte W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol.* 2004; 4(3):187-191.
148. Pournaras S, Ikonomidis A, Kristo I, Tsakris A ve ark. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(2):574-575.
149. Brigante G, Luzzaro F, Perillib M, Lombardia G ve ark. Evolution of CTX-M-type – beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(2):157-162.
150. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G ve ark. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(8):2700-2706.
151. Ensor V M, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals J *Antimicrob Chemother.* 2006; 58(6):1260-1263.
152. Govinden U, Mocktar C, Moodley P, Sturm AW ve ark. CTX-M-37 in *Salmonella enterica* serotype Isangi from Durban, South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 ;28(4):288-91.
153. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E ve ark. Detection of CTX-M-type beta-lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4556-4661.
154. Moubareck C, Daoud Z, Hakime NI, Hamze M ve ark. Countrywide spread of community- and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae in Lebanon. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7):3309-3313.
155. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. Beta-lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 2007 ;121(3-4):197-214.
156. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *Ankem Derg* 2005;19(Ek 2):66-77.

157. Lartigue MF, Poirel L, Heritier C, Tolun V ve ark. First description of CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* in Turkey. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(2):315-316.
158. Gierczyński R, Szych J, Cieřlik A, Rastawicki W ve ark. The occurrence of the first two CTX-M-3 and TEM-1 producing isolates of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg in Poland. Int J Antimicrob Agents. 2003; 21(5):497-499.
159. Akova M. Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları. Önemli ve sorunlu Gram negatif bakteri infeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004 sf.85-94.