

Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında SHV-2, SHV-5, SHV-12 VE CTX-M-3 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Saptanması

Determination of SHV-2, SHV-5, SHV-12 and CTX-M-3 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Enterobacteriaceae Isolates: Scientific Letter

Hüseyin TAŞLI,^a
Dr. İ. Hakkı BAHAR^b

^aFarmasötik Mikrobiyoloji AD,
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
^bMikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 27.08.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 17.08.2010

*Bu çalışmanın bir kısmı 3. Ulusal Moleküler
ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde
(Ankara, 2004) poster bildirisi olarak
sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:
Hüseyin TAŞLI
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji AD,
İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
huseyin.tasli@ege.edu.tr

ÖZET Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygındır. Ancak Türkiye'de bu enzimlerin moleküler tiplerine ilişkin veriler sınırlıdır. GSBL'ler başlangıçta çoğunlukla TEM ve SHV türevi olarak saptanmıştır. Son yıllarda ise CTX-M enzimleri daha baskın hale gelmiştir. Bu çalışmada GSBL olumlu, TEM ve/veya SHV geni taşıyan klinik Enterobacteriaceae izolatlarında CTX-M ve PER genlerinin araştırılması ve tüm enzimlerin DNA dizilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan elde edilen 28 kökende CTX-M ve PER beta-laktamazların varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. PCR pozitif kökenlere PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ve DNA dizi analizleri uygulanmıştır. PCR ile üç kökende CTX-M geni saptanırken hiçbir kökende PER genine rastlanmamıştır. RFLP analizine göre bütün CTX-M enzimlerinin CTX-M-1 grubuna ait olduğu görülmüştür. İki yönlü DNA dizi analizi sonucunda, dört suşta SHV-2, 14 suşta SHV-5, 10 suşta SHV-12 ve üç suşta CTX-M-3 saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enterobacteriaceae, beta-laktamazlar, polimeraz zincir reaksiyonu, restriksiyon analizi, DNA dizi analizi.

ABSTRACT Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) are common in our country as well as in the world. However, data about the molecular types of these enzymes are lacking in Turkey. ESBLs were initially determined commonly as TEM and SHV derivatives, but in recent years CTX-M enzymes have become more dominant. The aim of the study was to investigate of CTX-M and PER genes in Enterobacteriaceae isolates which were positive for ESBL and carried TEM and/or SHV genes, and to determine DNA sequences of all enzymes. Presence of CTX-M and PER beta-lactamases was investigated with polymerase chain reaction (PCR) method in 28 strains obtained from the Microbiology Laboratory of Dokuz Eylül University Medical School. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequence analysis were performed on PCR positive strains. While CTX-M gene was determined in three strains using PCR, PER gene was determined in none of the strains. All CTX-M enzymes were found to belong to CTX-M-1 group according to RFLP analysis. As a result of both strands DNA sequence analysis, SHV-2 in four strains, SHV-5 in 14 strains, SHV-12 in 10 strains and CTX-M-3 in three strains were determined.

Key Words: Enterobacteriaceae, beta-lactamases, polymerase chain reaction, restriction analysis, DNA sequence analysis

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(5):1701-6

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) çoklu ilaç dirençli bakteriyel izolatlar içinde önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir. İlk tanımlandıkları 1980'lerin başından itibaren dünya çapında yaygınlaşmışlardır. 1990'ların sonuna kadar çoğunlukla TEM ve SHV

olarak bulunmuştur. Bu durum son beş yılda dramatik bir şekilde değişerek CTX-M enzimleri en yaygın GSBL tipi haline gelmiştir.¹ PER, OXA, TLA ve GES ise daha az rastlanan enzim gruplarıdır. 1980 yılından günümüze kadar 300'den fazla GSBL tanımlanmıştır (<http://www.lahey.org/studies>). Bunların büyük çoğunluğu TEM, SHV ve CTX-M varyantıdır. *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* tüm dünyada en sık izole edilen GSBL üreticileri olma özelliklerini korumaktadırlar.² GSBL'ler neredeyse bütün Avrupa ülkelerinde yaygındır ve genellikle de Enterobacteriaceae izolatlarında saptanmaktadır.³ Ülkemizde yapılan çalışmalar GSBL'lerin yüksek oranda saptandığını göstermektedir. Ancak bu enzimlerin moleküler tiplerine ait veriler sınırlıdır. Bu çalışmada GSBL pozitif, TEM ve/veya SHV gen varlığı bilinen klinik Enterobacteriaceae izolatlarında CTX-M ve PER genlerinin araştırılması ve tüm enzimlerin DNA dizi analizi ile tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi klinik örneklerinden soyutlanan GSBL pozitif 28 Enterobacteriaceae izolatı çalışmaya alındı. İzolatlar ve bunların transkonjugantlarının önceki çalışmamızla⁴ belirlenmiş olan çeşitli fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Tamamı SHV ve 12'si TEM geni taşıyan 28 kökenin transkonjugantlarında CTX-M ve PER genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı. Tablo 2'deki primer setleri⁵⁻¹⁰ kullanılarak PCR reaksiyonları Techne (Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. CTX-M PCR için öncelikle tarama amacıyla tüm grupları yakalayabilen ortak bir primer seti (CTX-MU) kullanıldı. Çalışmada CTX-M ve PER¹¹ varlığı bilinen örnekler pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR ürünleri 100 bp DNA marker eşliğinde agaroz jel elektroforesi-etidyum bromid yöntemi ile incelendi.

CTX-M enzimlerini grup düzeyinde tiplendirmek için *Pst*I ve *Pvu*II (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) restriksiyon enzimleri kullanıldı.¹² Restriksiyon profiline göre gruba özgü primer seti kullanılarak PCR ile doğrulama yapıldı.

DNA dizileme reaksiyonu için önceki çalışmamızdan elde edilen TEM ve SHV ile bu çalışma-

dan elde edilen CTX-M ve PER PCR ürünleri, saflaştırma kiti (DNA purification kit, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) ile saflaştırıldıktan sonra DNA konsantrasyonu 50 ng/ml ve primer setleri (Tablo 2) 10 pmol/ml olacak şekilde ayarlanarak çift yönlü ham DNA dizileri sağlandı (Macrogen Company, Seoul, Korea).

Her PCR ürünü için elde edilen iki dizi karşılaştırılarak tek dizi haline getirildi. Elde edilen diziler gen bankasından (GenBank) alınan referans diziler ile "BioEdit 7.0.9 Sequence Alignment Editor" programı kullanılarak hizalandı ve aminoasit dizilerine çevrildi. Hem nükleotit hem de aminoasit dizileri internet ortamında "blastn" ve "blastp" (nucleotide-blast, protein-blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) programları ile gen bankalarında sorgulandı. Ayrıca Ambler modeli esas alınarak amino asit dizileri "Jacoby G, Bush K. <http://www.lahey.org>" web sitesindeki amino asit dizileri ile karşılaştırılarak tiplendirildi.

PCR sonuçlarına göre Tablo 1'de belirtilen 28 suşun tamamında SHV ve 12'sinde TEM varlığına ilave olarak iki *E. coli* ve bir *K. pneumoniae* olmak üzere üç suшта CTX-M saptanmıştır. PER genine ise hiçbir suшта rastlanmamıştır. PCR-RFLP yöntemiyle CTX-M tipi enzimlerin CTX-M-1 grubu ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Grup spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmalarıyla örneklerin CTX-M-1 grubuna ait oldukları ve diğer gruplara ait olmadıkları doğrulanmıştır.

PCR ürünlerinin iki yönlü DNA dizi analizi sonucunda 12 suшта TEM-1, dört suшта SHV-2, 14 suшта SHV-5, 10 suшта SHV-12 ve üç suшта CTX-M-3 saptanmıştır. Suşların 12'sinde SHV enzimleri ile TEM-1 birlikte yer alırken bir suшта SHV-2 ve CTX-M-3, bir suшта SHV-12 ve CTX-M-3, bir suшта ise TEM-1, SHV-5 ve CTX-M-3 birlikteliği gözlenmiştir (Tablo 3).

GSBL'lerin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygın olduğu bilinse de bu enzimlerin moleküler tiplerine ilişkin veriler sınırlıdır. Türkiye'de TEM tipi GSBL, bildiğimiz kadarıyla sadece Yumuk ve ark.¹³ tarafından toplum kökenli *E. coli* suşlarında saptanmış ve TEM-

TABLO 1: Enterobacteriaceae klinik izolat ve transkonjugantlarının özellikleri

İzolat NO	MIK (µg/mL)												PCR-RFLP ^e											
	AMX		AMC		FOX		ATM		CAZ		CRO		CTX		IMP		GSBL		PCRa		SHV		Beta-laktamaz izoelektrik nokta ^a	
Tür	Ki	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	Ki	TR	TEM	SHV	SHV _{GSBL}	SHV _{NheI}	
DE25	Kp	>256	>256	32	8	128	4	128	8	128	2	64	4	128	4	4	1	+	+	-	+	+	+	7.6
DE23232	Kp	>256	>256	8	4	8	<0.25	16	<0.25	32	<0.25	128	<0.25	128	0.5	1	0.5	+	+	-	+	+	+	7.6
DE20766	Kp	>256	>256	4	4	4	16	16	16	16	8	16	8	16	8	2	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 9.1
DE20820	Kp	>256	>256	32	8	4	64	<0.25	64	<0.25	128	<0.25	128	<0.25	4	1	+	+	+	+	+	+	+	5.4, 7.6, 8.8
DE47	Kp	>256	>256	8	4	4	>128	32	>128	64	16	64	2	64	4	1	+	+	-	+	+	+	+	8.0
DE48	Kp	>256	>256	16	4	4	>128	>128	>128	>128	>128	64	64	64	64	1	1	+	+	-	+	+	+	7.6, 8.0, 8.7
DE8338	Kp	>256	>256	8	4	4	>128	16	>128	32	128	4	64	4	2	1	+	+	-	+	+	+	+	8.2, 8.5
DE11823	Kp	>256	>256	4	2	16	4	>128	32	>128	16	128	1	128	4	4	2	+	+	-	+	+	+	8.6, 9.1
DE15780	Kp	>256	>256	4	2	8	2	>128	16	>128	8	128	0.25	64	0.5	0.5	0.5	+	+	-	+	+	+	8.6, 9.1
DE17684	Kp	>256	>256	8	4	16	2	>128	>128	>128	>128	64	32	32	2	1	+	+	-	+	+	+	+	8.3, 8.6-8.7, 9.1
DE18782	Kp	>256	>256	8	1	4	4	>128	<0.25	>128	<0.25	>128	<0.25	128	<0.25	2	1	+	+	-	+	+	+	7.6
DE19111	Kp	>256	>256	1	4	4	4	64	32	64	32	64	32	32	16	0.5	0.5	+	+	-	+	+	+	8.6-8.7, 9.1
DE8282	Enc	>256	>256	64	16	128	2	32	<0.25	128	<0.25	128	<0.25	128	<0.25	4	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 8.2
DE15681	Kp	>256	>256	16	8	64	2	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	64	2	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 8.0, 8.7
DE19940	Ec	>256	>256	4	4	8	4	>128	>128	>128	16	>128	>128	>128	>128	1	1	+	+	+	+	+	+	7.6, 8.0, 8.7
DE23774	Kp	>256	>256	32	2	2	2	>128	>128	>128	>128	>128	64	128	64	2	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 8.0, 8.5
DE27403	Kp	>256	>256	32	16	2	2	>128	>128	>128	>128	>128	128	128	128	2	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 8.0, 8.5
DE27449	Kp	>256	>256	64	32	2	2	>128	>128	>128	>128	>128	8	64	16	2	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 8.0, 8.5
DE23	Kp	>256	>256	1	1	2	2	64	16	64	16	64	2	32	2	1	1	+	+	-	+	+	+	8.1, 8.5, 9.1
DE42	Kp	>256	>256	2	2	4	4	64	64	32	16	4	1	4	2	1	1	+	+	-	+	+	+	8.1, 8.5, 9.1
DE45	Kp	>256	>256	4	2	4	4	128	64	128	32	64	4	32	2	2	1	+	+	-	+	+	+	8.0
DE6741	Kp	>256	>256	4	2	2	2	8	<0.25	32	<0.25	64	<0.25	64	<0.25	1	1	+	+	-	+	+	+	7.6
DE7363	Kp	>256	>256	4	1	4	2	>128	32	>128	16	128	64	64	32	1	1	+	+	-	+	+	+	8.3, 8.7, 9.1
DE17706	Ec	>256	>256	8	4	32	4	>128	128	8	1	>128	>128	>128	>128	2	1	+	+	-	+	+	+	7.6, 8.0
DE10	Ec	>256	>256	4	4	8	2	64	16	64	16	64	4	32	4	1	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 5.8, 7.0-7.1, 8.2-8.3
DE36	Kp	>256	>256	16	4	128	2	>128	32	>128	32	32	32	32	32	4	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 5.8, 6.9-7.0, 8.2-8.3
DE12056	Ec	>256	>256	4	2	4	2	32	16	16	8	16	8	16	8	1	1	+	+	+	+	+	+	5.4, 6.0-6.1, 6.8-6.9, 8.2-8.4
DE20267	Ec	>256	>256	8	4	8	4	128	16	128	16	64	16	32	8	0.25	0.25	+	+	+	+	+	+	5.4, 5.8, 6.8-7.0, 8.5

^a: Transkonjugant verileridir.

^b: GSBL varlığı SHV-restriksion analizi ile saptanmıştır.

^c: PCR/ NheI restriksion analizi SHV tipi GSBL'leri GSBL olmayanlardan ayırmayı sağlar. NheI enzimi SHV tipi GSBL'lerin çoğunluğunda, 238. aminoasit pozisyonunda Glisin→Serin değişimine sebep olan G→A baz değişikliğine özgüdür.

Ki: Klinik izolat. TR: Transkonjugant. AMX: Amoxicillin. AMC: Amoxicillin/ clavulanic acid. FOX: Cefoxitin. ATM: Aztreonam. CAZ: Cefazidime. CTX: Ceftriaxone. IMP: Imipenem.

Kp: K.pneumoniae. Ec: E.coli. Enc: E.coliaceae

TABLO 2: PCR ve DNA dizi analizinde kullanılan primer setleri.

Primer	Dizi (5' → 3')	Ürün Uzunluğu	Kaynak
TEM-F	GAAGACGAAAGGGCCTCGTG	1074 bp	5
TEM-R	GGTCTGACAGTTACCAATGC		
SHV-F	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	1016 bp	6
SHV-R	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA		
*CTX-MU1	ATGTGCAGYACCAAGTAARGT	593 bp	7
*CTX-MU2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA		
CTX-1F	CCCATGGTTAAAAATCACTG	891 bp	8
CTX-1R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
CTX-2F	ATGATGACTCAGAGCATTGCGC	893 bp	8
CTX-2R	TCGCTCCATTTATTGCATCA		
CTX-8F	ATGTTAATGACGACAGCCTGTG	689 bp	8
CTX-8R	CCGGTTTTATCCCCGACA		
CTX-9F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	864 bp	9
CTX-9R	CCCTTCGGCGATGATTCTC		
PER-F	ATGAATGTCATTATAAAAGC	930 bp	10
PER-R	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA		

*CTX-M PCR için tüm CTX gruplarını yakalayabilen ortak primer seti/

3, TEM-24 olarak tiplendirilmiştir. Çalışmamızda, incelenen tüm TEM genlerinin, referans enzime (TEM-1) göre bazı nükleotid değişiklikleri görülse de, aminoasit düzeyinde TEM-1 enzimini kodladıkları görülmüştür.

Ülkemiz kaynaklı tanımlanan ilk SHV tipi GSBL örnekleri SHV-2 ve SHV-5 olup 2003 yılında Paterson ve ark. tarafından Türkiye kökenli *K. pneumoniae* kan kültürü izolatlarında rapor edilmişlerdir.¹⁴ Daha sonra bizim çalışmamızda SHV-2

ve SHV-5'e ilave olarak ilk kez SHV-12 rapor edilmiştir.⁴ Bu çalışmamızda da önceki çalışmamızla uyumlu olarak SHV-2, SHV-5, SHV-12 saptanmıştır. SHV-12 tüm dünya üzerinde *K. pneumoniae* kökenlerinde en sık rapor edilen enzimlerden biridir. Son yıllarda toplum kökenli *E. coli* izolatlarında da sıklığı artmaktadır.¹⁵⁻¹⁷ Yumuk ve ark. İzmir Bölgesi toplum kökenli *E. coli* izolatlarında da SHV-12 rapor etmişlerdir.¹³ Aynı zamanda SHV-12'nin diğer enzimler ile birlikte eksprese olması sıkça rapor edilen bir durumdur.¹⁸⁻²⁰ Bu çalışmada da SHV-12'nin TEM-1 veya CTX-M-3 ile birlikte yer aldığı görülmüştür (Tablo 3).

Çalışmamızda, CTX-M-1 grubundan CTX-M-3 saptanması, Türkiye'de CTX-M enzimleriyle ilgili sınırlı sayıdaki çalışmayla paralellik göstermektedir. Türkiye'den rapor edilen CTX-M enzimlerinin neredeyse tamamı CTX-M-1 grubuna aittir. Açıköz ve ark.²¹ 2003 yılında sefotaksim ve aztreonam dirençli *Shigella sonnei*, Bahar ve ark.²² 2006 yılında sefotaksim, aztreonam, sefepime dirençli *Salmonella Enterica* serovar Virchow, Metan ve ark.²³ 2007 yılında *Morganella morganii* izolatında CTX-M-3 enzimi saptamışlardır. 2003 yılında Lartigue ve ark.²⁴ *K. pneumoniae*, 2008 yılında Gönüllü ve ark.²⁵ *E. coli* ve yine 2008 yılında Yumuk ve ark.¹⁰ İzmir'de toplum kökenli *E. coli* izolatlarında CTX-M-15 saptamışlardır. Bu bulgulara göre CTX-M-1 grubuna dahil olan CTX-M-3 ve CTX-M-15 enzimlerinin ülkemizde yaygın olduğu düşünülebilir. Bu veri-

TABLO 3: DNA dizi analizine göre çalışma suşlarının beta-laktamaz tipleri.

Tür	Suş No	Beta-laktamaz tipleri
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DE25	SHV-2 + CTX-M-3
	DE23232	SHV-2
	DE20766, DE20820	TEM-1 + SHV-2
	DE47, DE48, DE8338, DE11823, DE15780, DE17684, DE18782, DE19111	SHV-5
	DE15681, DE23774, DE27403, DE27449	TEM-1 + SHV-5
	DE23, DE42, DE45, DE6741, DE7363	SHV-12
	DE36	TEM-1 + SHV-12
	<i>Escherichia coli</i>	DE10, DE12056, DE20267
	DE19940	TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-3
	DE17706	SHV-12 + CTX-M-3
<i>Enterobacter cloacae</i>	DE8262	TEM-1 + SHV-5

ler Avrupa ülkeleriyle de benzerlik göstermektedir. CTX-M-15 tüm Avrupa, CTX-M-3 ise Doğu Avrupa ülkelerinde en yaygın bulunan enzimlerdir.^{1,3} CTX-M-1 grubu dışında Paterson ve ark. yedi ülkeyi kapsayan çalışmalarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi kaynaklı *K. pneumoniae* kökeninde CTX-M-2 enzimini saptamışlardır.¹⁴

CTX-M enzimlerini gruplandırmak amacıyla *PstI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri kullanılarak uygulanan PCR-RFLP yöntemi,¹² çalışmamız sonuçlarına göre hem teorik hem de deneysel olarak CTX-M tipi beta-laktamazların grup düzeyinde hızlı ve kolaylıkla tiplendirilebileceğini göstermiştir. Bu analiz sonucu örneklerin CTX-M-1 grubu olduğu, hem grup spesifik PCR testleri hem de DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *E. coli*, *Klebsiella* türleri ve Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyeleri, günümüzde hastane infeksiyonlarının en önemli etkenleri arasında yer alırlar ve çoklu dirençli mikroorganizmalardır.²⁶ Antibiyotik direncinin engellenmesi için ülkemiz GSBL profilinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Sonuç olarak çalışmamızda, DNA dizi analizi sonucu klinik Enterobacteriaceae izolatlarında SHV tipi GSBL'lerden sadece SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 saptanmıştır. Önceki araştırmalarımız da dikkate alındığında, bu enzimlerin bölgemizde yaygın olabileceği sonucuna varılmıştır. Yine bu çalışmada saptanan CTX-M-3 enziminin diğer Türkiye kaynaklı araştırmalarda saptanmış olması, bu enzimin Avrupa'da olduğu gibi ülkemizde de yaygın olabileceğini düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):144-53.
- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;(3):159-66.
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(2): 165-74.
- Taşlı H, Bahar İH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(3):162-7.
- Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(8):3737-41.
- Nüesch-Inderbinen MT, Hächler 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(5):398-402.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. 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):4264-9.
- Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, et al. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *J Appl Microbiol* 2005;98(4):921-7.
- Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209(2):161-8.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(8):2385-92.
- Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol (Praha)* 2007;52(5):535-41.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(12):3724-32.
- Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(2):284-8.
- Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(11):3554-60.
- Valverde A, Coque TM, Sa'nchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42(10): 4769-75.
- Miró E, Mirelis B, Navarro F, Rivera A, Mesa RJ, Roig MC, et al. Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1152-5.
- 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):52-9.
- Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(4):698-702.

19. Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(8): 625-31.
20. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006;42(1):37-45.
21. Acikgoz ZC, Gulay Z, Bicmen M, Gocer S, Gamberzade S. CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase in a *Shigella sonnei* clinical isolate: first report from Turkey. *Scand J Infect Dis* 2003;35(8):503-5.
22. Bahar G, Mert A, Catania MR, Koncan R, Benvenuti C, Mazzariol A. A Strain of *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated in Turkey and carrying a CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 2006;18(3):307-10.
23. Metan G, Gulmez D, Eser OK, Kocagöz S, Sardan YC, Hascelik G. CTX-M-3-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Morganella morganii*: first description of an isolate from Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(4):368-70.
24. Lartigue MF, Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(2):315-6.
25. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, et al. Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol* 2008;46(3):1110-2.
26. Yalçın AN. [Antibiotic usage and resistance problem in intensive care unit]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006;2(46):23-31.