

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri

Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and Identification Methods

Duygu Dağlar¹, Gözde Öngüt²

¹Serik Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANTALYA

²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTALYA

Özet

Klasik TEM ve SHV türü enzimlerden nokta mutasyonu ile gelişmiş olan Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL), son 30 yılda önemli bir direnç mekanizması olarak ortaya çıkmış olup tanımlanan enzim sayısı 200'e ulaşmıştır. Bu enzimleri kodlayan genlerin çoğu plazmidler ile yayılım göstermekte ve genellikle beraberinde beta-laktam yapısında olmayan diğer antibiyotiklere karşı da direnç genleri taşımaktadır. En uygun tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve diğer standart rehberlerde özellikle *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatları için rutin olarak GSBL varlığının tarama ve doğrulama testleri ile araştırılması önerilmektedir. Bu amaçla geliştirilen testlerin çoğu üretilen enzim klavulanik asit varlığında inhibisyonunun gözlenmesi esasına dayanır. Rutin laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılan Çift Disk Sinerji yöntemi, ucuz ve uygulaması kolay bir yöntem olarak tatmin edici sonuçlar vermektedir. Ancak bu testte sonuç alınması için en az 18-24 saat gerekmekte ve bazı enzim türleri saptanamayabilmektedir. Son yıllarda geliştirilen kromojenik testler ve moleküler yöntemlerle kısa sürede sonuç alınabilse de uygulama zorlukları nedeniyle yaygın kullanımları sınırlı kalmaktadır. Bu derlemede GSBL enzimlerinin klinik önemi, türleri ve in vitro tanımlanılan yöntemler üzerinde durulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Direnç, GSBL, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Abstract

Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) which develop from classic TEM and SHV beta-lactamases by point mutations have been emerged as significant resistance mechanisms for last 30 years, and their number has reached about 200. The most of the genes encoding these enzymes are transferred on the plasmids and they frequently co-transfer some genes that are responsible for the resistance to other antimicrobials which are not in beta-lactam structure. To select the most appropriate therapy choices, some guidelines including Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) have recommended to routinely determine the production of ESBLs with applying screening and confirmative tests for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. Majority of the tests for ESBLs detection are based on the visualization of the enzyme inhibition in the presence of clavulonic acid. Double Disc Synergy test, one of the most widely used in the routine laboratory interventions, is a cheap and easy-to-apply method, and gives satisfactory results. However, in this test, 18-24 hours are required to obtain the result, and some types of enzymes can not be identified. The chromogenic tests and molecular methods which are developed in the recent years may give result in a shorter time, but their usages are limited due to difficulties for application. In this review, clinical importance of ESBL enzymes, their types and in vitro diagnostic methods will be discussed.

Key Words: Resistance, ESBL, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Giriş

Beta-laktamlar, gösterdikleri üstün etki spektrumları, mikroorganizmalar için yüksek ve seçici toksisiteleri, neredeyse tüm yaş gruplarında uygulanabilir olmaları, diğer gruplara göre relatif olarak düşük yan etki insidansları ve tüm vücut sıvılarına olan üstün dağılım özellikleri nedeniyle günümüzde en çok reçete edilen antibiyotikler olmuştur. Lisanslı tüm antibiyotikler içinde bu ilaçların sayısal ağırlığı %70'e yakındır. Ancak, gereksiz-uygunsuz-yoğun kullanım ve hastanelerde infeksiyon kontrol yöntemlerinin yeteri kadar uygulanmaması nedeniyle bakterilerin bu antibiyotiklere olan direnci yıllar içinde hızla artmıştır. Beta-laktamaz sentezi enterik Gram negatif bakteriler için en önemli antibiyotik direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağımlı parçalayarak etki gösterirler. Beta-laktamaz genleri, bakteride kromozom kontrolünde veya plazmid

ya da transpozonlarda yerleşmiş genler üzerinde kodlanmaktadır. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi plazmid kaynaklı beta-laktamazlar *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaygın bulunan enzimler olup, bunlar plazmidler aracılığıyla diğer bakterilere aktarılırlar (1). Plazmid kaynaklı beta-laktamazlar, başlangıçta penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen enzimler iken sonraları bu enzimleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) adı verilen, üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen yeni beta-laktamazlar olarak tanımlanmıştır (2). Bu enzimlerin en önemli özelliği genellikle klavulanik asit, daha az olarak da sulbaktam veya tazobaktam gibi inhibitörlere duyarlı olmalarıdır. GSBL enzimleri esas olarak TEM ve SHV enzimlerinden köken alsalar da TEM ve SHV kökenli olmayan CTX-M, OXA-1, PER-1, PER-2 gibi yeni

plazmid kaynaklı GSBL'ler de tanımlanmıştır. Bu yeni enzimler sefamisinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinlere karşı etkilidir (3). GSBL'ler ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak bulunur. Günümüzde 200'den fazla GSBL tanımlanmıştır (4).

GSBL üreten suşlarla oluşan infeksiyonlar sıklıkla, hastanede uzun süre yatan, büyük cerrahi operasyon geçiren, arteriyel ve üriner kateteri olan ve özellikle yoğun bakım servislerindeki hastalarda görülmektedir. ancak son yıllarda toplum kökenli infeksiyonlarda da sıklığının arttığı görülmüştür. GSBL'ler en sık hastane kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında görülmekle birlikte diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de saptanmaktadır (5).

GSBL enzimleri plazmid aracılığıyla kolay yayılmaları, salgınlara yol açabilmeleri, bu suşların etken olduğu infeksiyonlarda tedavi başarısızlığı ve mortalite artışı gibi ciddi klinik problemlerin ortaya çıkışı nedeniyle günümüz hastanelerinde önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Bu nedenle bu enzimlerin laboratuvarında iyi tanımlanması tedavinin doğru yönlendirilmesi bakımından önem taşır.

Beta-laktamazların kısa tarihi

Beta-laktamazlar; beta-laktam halkasında bulunan amid bağı parçalayarak bu tür antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Penisilin, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedildikten sonra 1940 yılında Abraham ve Chain *E. coli*'den elde ettikleri özütün penisilinini etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar elde ettikleri enzime "penisilinaz" adını vermişlerdir (6).

1960'lardan sonra semisentetik penisilinler, metisilin ve ampisilin, 1. kuşak sefalosporinlerden sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesiyle Gram negatif çomaklarda bulunan beta-laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Gram negatif bakterilerde çok daha fazla çeşitte beta-laktamaz bulunduğu ve plazmid kontrolünde sentezlenebildiğinden çok kısa sürede dirençte artış gözlenmiştir.

Beta-laktamazlarla hidrolize olmayan yeni beta-laktamaların geliştirilmesi 1980'li yıllarda 3. kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Almanya'da 1983 yılında bir *K. pneumoniae* suşunda, 3. kuşak sefalosporinleri de parçalayan plazmid kaynaklı bir beta-laktamaz bulunmuştur (7). Bu yeni beta-laktamaz *Klebsiella spp.* türlerinde sık olarak bulunan SHV-1 beta-laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 enzimidir. Ardından, Fransa'da seftazidime dirençli *K. pneumoniae* suşlarında, seftazidimi hidrolize eden TEM-2 enziminden yalnız iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı beta-laktamaz belirlenmiştir (3).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en sık Ambler moleküler sınıflandırması ile Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması kullanılmaktadır (8, 9). Ambler sınıflandırmasında beta-laktamazlar, enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine göre dört sınıfa ayrılır. A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar serin beta-laktamazlar; B sınıfı beta-laktamazlar ise metallo-beta laktamazlar olarak isimlendirilirler. Beta-laktamazların en yeni sınıflandırma şeması olan Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından yapılan sınıflandırmada ise beta-laktamazlar biyokimyasal özelliklerine ve substrat profillerine göre dört gruba ayrılır.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, Ambler moleküler sınıf A'da yer alan grup 2be, grup 2e ve sınıf D (grup 2d) beta-laktamazlardan oluşur. Bu enzimlerin etki spektrumlarının oksimino-beta-laktamları da kapsamı nedeniyle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar olarak adlandırılmışlardır. GSBL'ler; geniş spektrumlu penisilinlere, 1., 2., ve 3. jenerasyon sefalosporinlere ve kısmen sefepime etkili, karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler.

Klasik olarak tanımlanan GSBL'lerin büyük çoğunluğu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden köken almıştır. Köken alınan ana enzimin moleküler yapısındaki aminoasitlerden bir ile dördünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi sonucu GSBL'lar oluşur. Günümüzde TEM türü beta-laktamazların sayısı 130'u, SHV türü beta-laktamazlarınki 50'yi geçmiştir. Bu üç enzimin türevleri dışında son yıllarda bunlardan köken almayan CTX-M, PER, VEB gibi genişlemiş spektrumlu enzimlerin sayısında artış olmuştur (10). SHV ve TEM türevi enzimler grup A'da yer almaktadır. OXA türevi olan GSBL'ler ise grup D'de yer alan oksasilinazlardır. GSBL türü enzimler Gram negatif bakterilerde sıklıkla bulunmaktadır. Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinden *K. pneumoniae*'da en sık gözlenmekle birlikte *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de de sıklığı artmaktadır (11). *Enterobacteriaceae* ailesi dışında GSBL üreten mikroorganizmaların sıklığı daha az olup bunların içinde en sık *P. aeruginosa*'da gözlenmektedir (12).

GSBL Türleri

TEM grubu GSBL'ler

Plazmid kökenli bilinen en eski enzim olan TEM-1, ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin direncine neden olur. TEM-1, Gram negatif bakterilerde en sık kodlanan enzimidir ve ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında dirençten bu enzim sorumludur. TEM-1'in yapısında bir aminoasit değişikliğine (39. pozisyondaki glutamin yerine lizinin geçmesi) neden olan mutasyon sonucu TEM-2, bu enzimin yapısında 2 aminoasit değişikliği ile de TEM-3 ortaya çıkar. TEM-1 ve TEM-2 etki spektrumu açısından benzer penisilinazlardır. Sıklıkla

transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup; penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edebilirler. Ancak oksiiimino-sefalosporinlere karşı aktiviteleri yoktur (13).

İlk TEM varyantının bildirimden günümüze kadar, mutasyonlar sonucu gelişen aminoasit değişikliklerinin kombinasyonları sonucu 150'den fazla bu enzimin yeni türü tanımlanmıştır. Birçoğu GSBL aktivitesine sahip iken, bazı varyantlar inhibitör dirençli beta-laktamaz özelliğindedir (14). İnhibitör dirençli TEM (IRT) türündeki enzimler, geniş spektrumlu sefalosporinleri inhibe etmediklerinden gerçek anlamda GSBL olarak kabul edilmezler. Günümüzde sayısı 20'den fazla bulunan IRT türü enzimler klasik GSBL'lerin aksine beta-laktamaz inhibitörlerinin etkilerine (özellikle sulbaktam ve klavulanik asit) karşı dirençlidir. Ancak tazobaktam bu enzimleri inhibe edebilmektedir.

TEM kökenli GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da tanımlanmış olmakla birlikte, *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde de bulunabilmektedir (15).

SHV grubu GSBL'ler

SHV-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*'da bulunur ve bu bakterideki plazmid aracılı ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. Bu enzimin üretimi ile ampisilin, tikarsilin ve piperasiline karşı direnç oluşturmaktadır. Oksiiimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (15). SHV türü enzimlerin ilk türü 1983 yılında bulunmuş ve SHV-2 olarak tanımlanmıştır. TEM grubu GSBL'lere kıyasla SHV-1'den köken alan enzim sayısı ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. Bunlarda karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin, 240. pozisyonda glutamin yerine lizin girmesidir. Sonuçta 238. pozisyondaki serin rezidüsü seftazidime, 240. pozisyondaki lizin rezidüsü ise seftoksime karşı hidroliz etkinliği açısından önemlidir. SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir.

CTX-M grubu GSBL'ler

Bu grup enzimler substrat olarak seftoksime tercih etmektedir. CTX-M tipi beta-laktamaz ilk olarak 1989 yılında Almanya'da *E. coli* suşunda saptanmıştır. Daha sonra, *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde üretimi gösterilmiştir. Günümüzde yaklaşık 80'den fazla CTX-M enzimi bildirilmiştir (4). CTX-M enziminin kaynağı TEM ve SHV enzimlerine göre farklıdır. SHV ve TEM tip GSBL'ler öncül enzimlerden aminoasit değişiklikleriyle oluşurken, CTX-M tip GSBL'ler konjugatif plazmid ya da transpozon aracılığı ile başka bakteriden horizontal gen transferiyle oluşurlar. CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın SHV ve TEM enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella spp.* ve *Shigella spp.* gibi

toplum kaynaklı infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir. CTX-M grubu enzimlerin sayısı hızla artmaktadır. *Enterobacteriaceae* izolatlarında saptanan bu enzimler, dünyanın birçok yerinden rapor edilmiştir (16).

OXA grubu GSBL'ler

OXA tip beta-laktamazlar oksasilini hidrolize etme yeteneklerinden dolayı bu ismi almışlardır. Bu grup enzimler fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almalarıyla TEM ve SHV enzimlerinden ayrılırlar. En sık *P. aeruginosa*'da bulunmakla birlikte diğer Gram negatif bakterilerde de saptanmaktadır. En yaygın olanı OXA-1 beta-laktamazıdır ve *E. coli* suşlarının %1-10'unda bulunmaktadır (17). Bu enzimlerin OXA-1 den OXA-10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler (15, 17, 18).

TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidrolize edebilen geniş spektrumlu enzimler olarak gelişmişlerdir (19). OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 seftoksime direnç oluşturmaktadır. OXA-31 ise seftopime direnç oluştururken seftazidime duyarlıdır (20). OXA-24 ayrıca karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Ancak bu enzim bir GSBL türü olarak sınıflandırılmamaktadır. Bu enzimlerin önemi, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olmaları ve hemen daima hastane infeksiyonlarından soyutlanan kökenlerden saptanmalarıdır (6).

PER grubu GSBL'ler

PER enzimleri ile TEM ve SHV tipi GSBL'ler DNA baz dizileri bakımından %25-27 oranında homoloji gösterirler (21, 22). İlk olarak Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır. PER-1 enzimi penisilin ve sefalosporinleri hidrolize eder ve klavulanik asit ile inhibe olur (23). *P. aeruginosa* dışında *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *A. faecalis* ve *P. mirabilis* suşlarında da gösterilmiştir (24, 25). PER-1 ile %86 homoloji gösteren PER-2 enzimi sadece Güney Afrika'dan bildirilmiştir (22).

VEB grubu GSBL'ler

VEB-1 enzimi; PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 oranında homoloji gösterir. Seftazidim, seftoksime ve aztreonama yüksek düzeyde direnç gösterirler ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. VEB-1 ilk olarak Vietnam'da bir *E. coli* suşunda saptanmıştır (26).

GES grubu GSBL'ler

GES-1 ilk olarak Fransa'da *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır (27).

Diğer GSBL'ler

Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğine sahip BES-1, TLA-1, TOHO-1-2, BES, SFO, TLA ve IBC gibi GSBL'ler bildirilmiştir (28).

GSBL epidemiyolojisi

GSBL üreten organizmaların sayısı tüm dünyada hızla artmaktadır. GSBL prevalansının ülkeler, şehirler, hastaneler arasında değiştiği; hatta aynı hastanedeki servisler arasında dahi farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (29). Yapılan çalışmalarda *Klebsiella* izolatlarında GSBL oranı Latin Amerika'da %42.7, Avrupa'da %21.7, Kuzey Amerika'da %5.8 olarak bildirilmiştir (30). Tonkic ve ark. (31) yaptıkları çalışmada GSBL oranını *E. coli*'de %4.7, *K. pneumoniae*'de ise %36.8 olarak bulmuşlardır. Son yıllarda ülkemizde *E.coli* izolatlarında %7.2-32, *Klebsiella spp.* izolatlarında ise %42-56.5 arasında değişen oranlarda GSBL pozitifliği tespit edilmiştir (32-34).

TEM ve SHV tipi enzimler doksanlı yıllarda en sık gözlenen GSBL enzimleri olup özellikle *K. pneumoniae*'de sık görülmekteydi (24). Günümüzde yapılan çalışmalarda ise CTX-M enzimlerinin daha yaygın hale geldiği ve özellikle toplum kökenli *E. coli* türlerinde bu enzimlerin sık görüldüğü bildirilmiştir (16, 24). CTX-M-3, SHV-2 ve SHV-5 Doğu Avrupa ülkelerinde hızla yayılmaktadır (35). Ülkemizde ise en sık CTX-M-15 görülürken (27), OXA-48 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının ve SHV-12 enziminin de sıklığının arttığı da bildirilmektedir (36).

Günümüzde GSBL üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Çelebi ve ark. (37) yaptıkları çalışmada *E.coli* suşlarında GSBL prevalansını %54.4 olarak saptarken, mortalite oranını GSBL üretmeyen *E.coli* enfeksiyonlarında %8, GSBL üreten *E.coli* enfeksiyonlarında ise %24.3 olarak bildirmişlerdir.

GSBL'ların klinikte neden olduğu sorunlar

a-Direnç: GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problemi gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezleyen Gram negatif bakteri saptandığında tüm geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli olarak kabul edilmelidir. Ayrıca bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda birçok beta-laktam dışı antibiyotige karşı genetik materyal taşıyabilmektedir. Dolayısıyla GSBL pozitif bir bakteride başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilir (38).

b-Hastaların kolonizasyonu: Hastanede yatan hastalarda GSBL sentezleyen bakterilerle

kolonizasyonu arttıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süre yoğun bakımda yatma, altta yatan ciddi ve ağır hastalık varlığı, invaziv işleme maruz kalma sayılabilir.

c-Laboratuvarında GSBL saptanmasında karşılaşılan sorunlar: GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görünebilir.

GSBL tanı yöntemleri

Enterobacteriaceae türlerinin GSBL üretim prevalansında artış, klinik izolatlarda yaygın olmaları, plazmid aracılığı ile kolay yayılmaları, salgın, sağaltım başarısızlığı, mortalite artması gibi ciddi klinik problemlere neden olmaları, rutin duyarlılık testleri ile tanımlanmalarının güç olması ve nedeniyle özel yöntemler ile doğru saptanmaları gerekmektedir (39). GSBL üreten bakteriler geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aztreonama dirençli oldukları halde rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı olarak bulunabilirler ve tedavi sırasında sorunlara yol açabilirler.

Klebsiella pneumoniae, *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella oxytoca*'da, GSBL enzimlerinin saptanması için CLSI tarafından fenotipik tarama ve doğrulama testlerinin kullanılmasını önerilmiştir.

Tablo 1. GSBL'lar için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µg/mL)
Sefotaksim	≤ 27	≥ 2
Seftiazidim	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksım	≤ 17	≥ 8
Aztreonam	≤ 27	≥ 2

GSBL tarama testleri

CLSI, sıvı mikrodilüsyon testi ile sefotaksim, seftiazidim, seftiazidim, seftiazidim, seftiazidim, seftiazidim MİK değerleri ≥2 µg/mL, sefpodoksım MİK değeri ise ≥8 µg/mL olarak saptandığında; ya da disk difüzyon testinde seftiazidim inhibisyon zonu çapının ≤22 mm, sefpodoksım zonu çapının ≤17 mm, aztreonam ve sefotaksim zonu çaplarının ≤27 mm; seftiazidim zonu çapının ≤25 mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmasını önermektedir (40). Fenotipik doğrulama yöntemlerinden hiç birisi Gram negatif bakterilerde GSBL yönünden %100 duyarlı ve özgül değildir. Günümüzde klinik izolatlarda GSBL'nin doğru tanımlanması gerekliliği tüm klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında benimsenmiştir.

GSBL doğrulama testleri

Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılmaktadır. Sık olarak kullanılan yöntemler şunlardır.

1. Kombine disk yöntemi
2. Çift disk sinerji yöntemi
3. E test yöntemi
4. Mikrodilüsyon yöntemi
5. Üç boyutlu test
6. Boronik asit yöntemi
7. Otomatize sistemler

1-Kombine disk yöntemi

McFarland 0.5 standart yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton besiyerine klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (39) (Şekil 1).

2-Çift disk sinerji yöntemi

Jarlier ve arkadaşları (41) tarafından geliştirilen ve GSBL'nin belirlenmesinde en yaygın kullanılan testlerden biridir. McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton besiyerine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) veya sefopodoksim (POD) diskleri yerleştirilir. On sekiz saat 35°C'de inkübasyondan sonra test edilen sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (39) (Şekil 2).

3-E-test yöntemi

"E-test ESBL" stripleri (AB Biodisk, İsveç), bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulanik asit (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulanik asit (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır (Şekil 3).



Şekil 1. Kombine disk yöntemi. a: seftazidim (30 µg), b: seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg) (39).

4-Mikrodilüsyon yöntemi

Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde ≥ 8 kat azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (39).

5-Üç boyutlu test (M3D)

Bakterilerin kanlı agar besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonları Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek 35°C'de dört saat inkübe edilir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözülürük enzim ekstraksiyonu yapılır. Standart disk difüzyon testi için Mueller Hinton agara ATCC 25922 *E. coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılır ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µL elde edilen enzimlerden konulur. Petriler 35 °C'lik etüvde bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan 3 mm'ye eşit ve 3 mm'den fazla distorsiyona neden olanlar "üç boyutlu test pozitif" olarak kabul edilir (42).

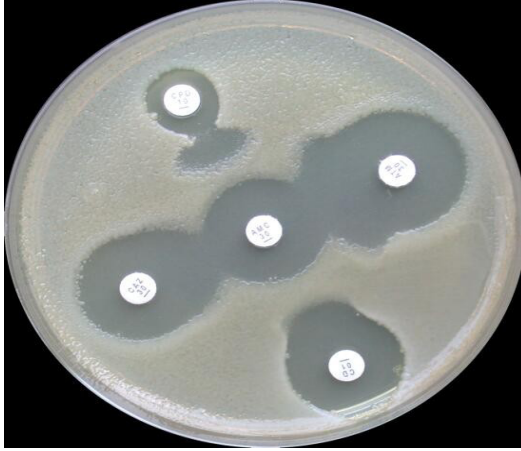
6-Boronik asit yöntemi

Bu yöntemde Boronik asidin AmpC beta-laktamaz aktivitesini inhibe etme özelliğinden yararlanır. Boronik asit yönteminin *K. pneumoniae* karbapenemaz pozitif suşlarının belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir. Fakat ticari hazır elde edilebilir olmaması ve sonuçların açıklanması için bir güne daha ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır (43).

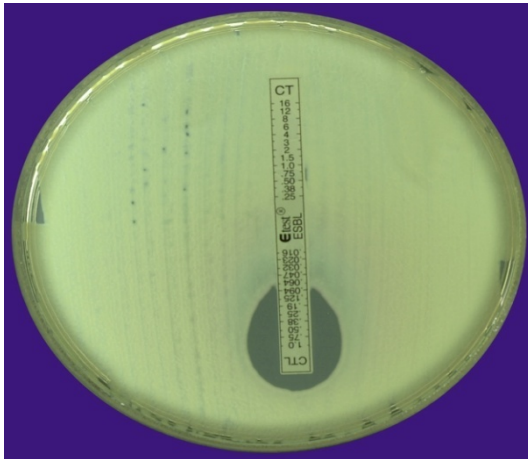
7-Otomatize sistemler

Bakteriyolojide kullanılan VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test gibi otomatize sistemler de GSBL üreten suşları saptayabilmektedirler. Bu sistemler; GSBL varlığını çeşitli kuralları işleterek tüm penisilinleri,

sefalosporinleri ve aztreonamı dirençli olarak rapor ederler. Bu sistemlerin özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarındaki direnci saptamakta yetersiz olduğu bildirilmektedir (44).



Şekil 2. Çift disk sinerji yöntemi. GSBL üreten suşlarda amoksisilin/klavulanik asit diskinin etrafına (20-30 mm) yerleştirilen seftazidim, sefepim, sefoksitin, aztreonam inhibisyon zon çaplarının genişlemesi (35).



Şekil 3. E test ile GSBL tayini. Okunan MİK değerlerine göre, CT/CTL ≥ 8 olması durumunda izolatin GSBL ürettiği kabul edilmektedir.

Hızlı tanı yöntemleri

GSBL üreten bakteriler için HMRZ-86 kromojenik substratının kullanıldığı bazı yöntemler bildirilmiştir. Bu kromojenik substratın kan kültürlerine eklenmesi ile GSBL üreten bakterilerin 15 dakika-2 saat (sıvı besiyerine pasaj yapıldığında) içinde saptanması mümkün olmaktadır (45). Bu substratın kullanıldığı Cica Beta Test (Kanto Chem, Japonya; Mast İngiltere) ile 2-15 dakikada GSBL, AmpC ve metallobetalaktamaz üretimi saptanabilmektedir.

Yine sefpodoksim içerdiği için GSBL üreten bakterileri seçmenin yanı sıra *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* ve *Proteae* grubu bakterilerin ayırımını yapabilen ChromID

ESBL (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) hızlı tanı sağlayan ticari kromojenik bir besiyeridir (46). Bir başka kromojenik besiyeri olan CHROMagar CTX'in ise, AmpC üreten izolatlarda bile CTX-M pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerini saptayabildiği bildirilmiştir (47).

Moleküler tanı yöntemleri

Spesifik GSBL tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gerek vardır. GSBL'nin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın belirlenmesi var olan GSBL'leri göstermek için yeterli olmaktadır. İzoelektrik odaklama yöntemi ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenerek hangi gruba dahil oldukları tahmin edilebilmektedir (48). Ancak sayıları 150'nin üzerinde olan TEM tipi enzimlerin çoğu özdeş izoelektrik noktasına sahip olduğundan enzim tiplerinin sadece izoelektrik noktalara dayanarak belirlenmesi artık mümkün görünmemektedir.

Günümüzde özgül enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. En sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntem beta-laktamaz genlerine spesifik oligonükleotid öncüllerin kullanıldığı PCR'dir. Bu yöntemle ancak enzimin bağlı olduğu aile saptanabilir, enzim varyantları arasında ayırım yapılamaz (9). Bu amaçla geliştirilen oligotyping yöntemi ile TEM-1, TEM-2 ayrımı yapılabilir (49). Oligotyping metodunda nokta mutasyonları saptayabilen proplar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sekans spesifik peptid nükleik asit (PNA)-bazlı multipleks PCR yönteminin *bla*-GES-2 identifikasyonunda standart PCR ve sekans yöntemlerine oranla daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (50).

Enzim genlerindeki nükleotid değişikliklerini tam olarak saptayabilen DNA dizi analizi yöntemi ise halen altın standart olma özelliğini korumakla birlikte, maliyeti yüksek ve emek gerektiren bir yöntemdir. Klinik izolatlarda GSBL varlığını saptama amacıyla kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2. de gösterilmiştir.

Sonuç

GSBL enzimleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak bulunmakta ve GSBL üreten Gram negatif bakteri infeksiyonları önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu infeksiyonların tedavisinde beta-laktam ajanların yaygın kullanımı GSBL üreten bakteri sıklığının artışına ve yeni türlerin ortaya çıkışına neden olmuştur.

GSBL sıklığı ve enzim tipleri tüm dünyada farklılıklar gösterse de GSBL varlığını ve enzim tipini belirlemek epidemiyolojik açıdan önemlidir. Bu amaçla geliştirilen izoelektrik odaklama yöntemi, beta-laktamazların bir çoğunda izoelektrik noktaların benzer olması nedeniyle tiplendirmede yetersiz kalmaktadır.

Tablo 2. Yöntemlerin üstünlüklerinin karşılaştırılması.

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
CLSI GSBL tarama testleri	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir
Çift disk sinerji	Uygulama ve yorum kolaylığı	Diskler arası mesafeler halen standart değil
Üç boyutlu test	Uygulama ve yorum kolaylığı	GSBL'ye özgül değildir.
E test	Uygulama kolaylığı	Duyarlılığı çift disk sinerji yönteminden daha düşük
Otomatize sistemler	Uygulama kolaylığı	Karbapenem dirençli <i>K. pneumoniae</i> suşlarındaki direnci saptamada düşük duyarlılık
İzoelektrik odaklama	Olası enzim gruplarını sınıflandırarak PCR testine öncül olma özelliğindedir.	Uygulama zor, benzer izoelektrik noktalı enzimleri ayırt etmekte yetersiz
PCR	Kolay uygulama, gen ailesine spesifik	TEM ve SHV varyantları arasında ayırım yapmada yetersiz
Oligotiplendirme	Özgül TEM varyantları saptanabilir	Yeni varyantlar tespit edilememekte
PCR-RFLP	Uygulama kolay, spesifik nükleotid değişiklikleri saptanabilir	Spesifik nükleotid değişiminin saptanmalıdır
Nükleotid dizi analizi	Altın standart. Yeni enzimler saptanabilir	Uygulanma zor, maliyet yüksek

Ancak olası enzimlerin gruplandırılmasını sağlayarak PCR gibi enzim sınıfını belirleyebilen moleküler testlere öncü olma özelliği taşımaktadır. Ülkemizin Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığı en yüksek olan ülkeler arasında yer alması, hastanelerde GSBL üreten bakterilerin sıklığının izlenmesini zorunlu kılmaktadır. GSBL'lerin hızlı artışı ve salgınlar, sağaltım başarısızlığı, artan mortalite gibi ciddi sorunlara neden olmaları, doğru saptanmalarını ve tiplendirilmelerini gerektirmektedir.

Her geçen gün artan beta-laktam direncine karşı her hastanenin kendi infeksiyon ve antibiyotik kontrol programlarının güncellenmesi ve titizlikle uygulaması gerekmektedir. Bakteriyel flora özellikleri ve direnç profiline bağlı olarak her kuruluş kendisi için en uygun GSBL izleme ve doğrulama yöntemini saptayarak uygulaması bu direncin yayılımının azaltılmasında yararlı olacaktır.

Kaynaklar

- Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1983; 12: 507-10.
- Sirot D. Extended-spectrum plasmid mediated beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 1995; 36: 19-34.
- Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13(1): 2-11.
- Jacoby G, Bush K. Lahey clinic page on amino acid sequence for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. <http://www.lahey.org/Studies>
- Mac Kenzie FM, Gould IM. Extended spectrum β -lactamases. J Infect 1998; 36: 255-58.
- Gür D. Beta-laktamazlar. Flora Dergisi 1997; 2:3-18.
- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1697-704.
- Ambler RP. The structure of beta lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289: 321-31.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.
- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11: 315-7.
- Winokur PL, Brueggemann, DeSalvo DL, et al. Animal and human multidrug resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2777-83.
- Nordmann P, Guibert M. Extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 128-31.
- Gür D. ESBL'ların Genel Özellikleri ve ESBL Tipleri. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004.
- Canton R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta lactamases and inhibitor resistance. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 53-62.
- Stürenburg E, Mack D. Extended spektrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect 2003; 47: 279-95.
- Livermore D. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother 2007; 59(2): 165-74.

17. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
18. Walter RJ, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 373-83.
19. Nordman P, Guibert M. Extended spektrum beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 1998; 42: 128-31.
20. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2001; 45: 2615-20.
21. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 104-14.
22. Bauernfeind A, Stemplinger I. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616-20.
23. Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-9.
24. Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.
25. Vahaboğlu H, Öztürk R, Aygün G, et al. Widespread detection of PER-1 type extended spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicentre study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-9.
26. Poir L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 573-81.
27. Poir L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamases, and the class I integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622-32.
28. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(S1): 42-52.
29. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe the Americans, and the Western Pasific Region. *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl2): 94-103.
30. Beindenbach DJ, Moet G J, Jones R. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial surveillance program (1997-2002). *Diag Microb Infect Dis* 2004; 50: 59-69.
31. Tonkic M, Barisic I. Prevalence and antimicrobial resistance of extended spectrum beta lactamases producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split. *Int Microbiol* 2005; 8: 119-24.
32. Işık F, Arslan U, Tuncer İ. Klinik örneklerden soyutlanan *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve antibiyotik duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; 21: 33-8.
33. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. *ANKEM* 2005; 19: 66-77.
34. Gür D, Gülay Z, Akan Arıkan Ö ve ark. Türkiye’de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: çok merkezli HİTİT surveyansının sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 537-44.
35. T M Coque, F Baquero, R Canton. Increasing prevalence of ESBL producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13: 47: 1-11.
36. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M type beta lactamases: an emerging group of extended spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 137-142.
37. Çelebi S, Yüce N, Çakır D, Hacımustafaoglu M, Özkaya G. Çocuklarda Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz Üreten *E. coli* Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri ve Klinik Sonuçları; Beş Yıllık Çalışma *Çocuk Enf Derg* 2009; 3: 5-10.
38. Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 761-6.
39. Gülay Z. ESBL’lerin tanı yöntemleri. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ (eds). *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar*. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004.
40. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. M100-S21. Wayne, Philedelphia, 2009.
41. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4): 867-78.
42. Barroso H, Freitas VA, Lito LM. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 611-6.

43. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. Clin Microbiol Newsletter 2009; 31(8): 55-62.
44. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol 2010; 48(12): 4417-25.
45. Tenover FC, Rajinder K, Williams PP. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis 2006; 12(8): 1209–13.
46. Jain S, Andrews J, Fraise A, Brenwald N. Rapid detection of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacilli in blood cultures. J Antimicrob Chemother 2007; 60(3): 652-4.
47. Réglie-Poupet H, Naas T, Carrer A, et al: Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases, J Med Microbiol 2008; 57(3): 310-5.
48. Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, Clifton-Hadley F: Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains, J Antimicrob Chemother 2009;63(2):302-8.
49. Matthew M, Harris AM, Marshall MM, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88: 169-78.
50. Tham TN, Mabilat C, Courvalin P, Guesdon JL. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol Lett 1990; 69: 109-16.

İletişim Yazarı

Dr. Duygu Dağlar

Serik Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

ANTALYA

e-posta:ddaglar77@hotmail.com