

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE ACINETOBACTER BAUMANNII
SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ
VARLIĞININ SAPTANMASINDA FARKLI FENOTİPİK
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

COMPARISON OF DIFFERENT PHENOTYPIC METHODS DETECTING
EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS

Pınar ZARAKOLU*, **Gökhan METAN****

Gülşen HASÇELİK***, **Murat AKOVA***

ÖZET: Hastane enfeksiyonu etkeni bakteriler içinde önemli bir yer tutan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığını saptayan yöntemler henüz standardize edilmemiştir. Bu çalışmada, farklı klinik örneklerden izole edilen seftazidim veya sefotaksim MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ üzerinde olan 38 *P. aeruginosa* ve 45 *A. baumannii* izolatında GSBL varlığının saptanması amacıyla, Epsilomer test (E-test), kombine disk (KD) ve çift disk sinerji (ÇDS) yöntemlerinin karşılaştırılması planlanmıştır. ÇDS yönteminin duyarlılığını artırmak amacıyla indikatör antibiyotikler içerisine sefepim dahil edilmiş, klavulanik asit içeren disk ile indikatör antibiyotikler arasındaki mesafe kısaltılarak değerlendirme yapılmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının %78.9'u seftazidim/seftazidim+klavulanik asit, %21.1'i sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit oranına göre E-test yöntemiyle GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların %31.5'inde ÇDS yöntemiyle, %84.2'sinde KD yöntemiyle GSBL enziminin varlığı tespit edilmiştir. *A.baumannii* suşlarının ise %93.3'ü seftazidim/seftazidim+klavulanik asit, %6.6'sı sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit oranına göre E-test yöntemiyle GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların da %20'sinde ÇDS yöntemiyle, %53.3'ünde KD yöntemiyle GSBL enziminin varlığı belirlenmiştir. Gerek E-test gerekse KD yöntemlerinde seftazidimle birlikte sefotaksimin de indikatör antibiyotik olarak kullanılmasının testin duyarlılığını artırdığı gözlenmiştir. ÇDS yönteminde sefepim kullanılması ve diskler arası mesafenin kısaltılması pozitiflik oranını artırmış, ancak E-test yöntemine kıyasla enzim saptanmasında yetersiz kalmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının %28.9'u, *A.baumannii* suşlarının ise %13.3'ü GSBL

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

sentezlemesine rağmen in vitro olarak seftazidime duyarlı bulunmuştur. Sonuç olarak, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında GSBL varlığının saptanması için E-test yönteminin en duyarlı fenotipik yöntem olduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), E-test, kombine disk, çift disk sinerji.

ABSTRACT: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* which are of great concern as the frequent causative agents of nosocomial infections, frequently exhibit resistance to beta-lactam antibiotics. One of the most common causes of this resistance is the presence of extended spectrum beta-lactamases (ESBL). There is still no standardized method for the detection of ESBLs in *P.aeruginosa* and *A.baumannii* strains. The aim of this study was to compare the results of Epsilomer test (E-test), combined disk (CD) and double disk synergy (DDS) methods for the detection of ESBL in a total of 38 *P.aeruginosa* and 45 *A.baumannii* strains with ceftazidim or cefotaxime MIC ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$, isolated from different clinical samples. Cefepime was included in the group of indicator antibiotics and the distance between clavulanic acid containing disk and indicator antibiotic disks was reduced to increase the sensitivity of DDS test. Of the *P.aeruginosa* strains, 78.9% was detected as ESBL producers by ceftazidime/ceftazidime-clavulanic acid and 21.1% detected by cefotaxime/cefotaxime-clavulanic acid ratio. Among this group of strains, 31.5% was positive by DDS test and 84.2% was positive by CD method. Of the *A.baumannii* strains, 93.3% of them was positive by ceftazidime/ceftazidime-clavulanic acid and 6.6% was positive by cefotaxime/cefotaxime-clavulanic acid ratio. DDS test detected 20% and CD method detected 53.3% of the strains positive by E-test method. The use of cefotaxime together with ceftazidime as an indicator antibiotic increased the sensitivity of detection of ESBL enzymes. Although inclusion of cefepime and reduction of the distance between disks increased the detection of ESBL by DDS method, it was still less effective than E-test. Although, 28.9% of the *P.aeruginosa* and 13.3% of the *A.baumannii* strains were susceptible to ceftazidime by in vitro tests, they were ESBL producers. In conclusion, E-test method was found to be the most sensitive phenotypic method for the detection of ESBL in our study collection.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, extended spectrum beta-lactamases (ESBL), E-test, combined disk, double disk synergy.

G İ R İ Ő

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enziminin varlığı ilk olarak 1980'lerde *Klebsiella ozaenae* izolatında tespit edilmiş, daha sonra *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyeleri ve *Pseudomonas aeruginosa* ile *Acinetobacter baumannii* suşlarının da bu enzimleri sentezledikleri saptanmıştır¹. Farklı yapıarda GSBL (TEM, SHV, CTX, PER, VEB, GES) üreten *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii*'nin etken olduğu hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir²⁻⁶. GES-2 tipinde GSBL üreten *P.aeruginosa* suşlarıyla

oluşan bir salgında mortalite %62.5 olarak rapor edilmiş, VEB-1 tipinde enzim salgılayan *A.baumannii* suşlarıyla gerçekleşen bir salgın ise, salgının meydana geldiği yoğun bakım ünitesinin kapatılmasıyla kontrol altına alınabilmiştir^{5,6}. Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada PER-1 enziminin *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır⁷. PER-1 tipi enzim salgılayan suşlarla enfeksiyon gelişmesinin, mortalite açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu yine çok merkezli bir vaka kontrol çalışmasıyla ortaya konmuştur⁸.

GSBL sentezleyen bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde, bu bakterilerin sahip olduğu çoklu antibiyotik direnci nedeniyle problemler yaşanmaktadır. Uygun tedavinin düzenlenebilmesi, direnç oranlarının izlenebilmesi ve gerekli enfeksiyon kontrol yöntemlerinin zamanında uygulanabilmesi için GSBL'ları saptayan yüksek duyarlılığa sahip yöntemlere gereksinim duyulmaktadır⁹. "The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* izolatlarında GSBL varlığının saptanması amacıyla disk difüzyon metodu ile yapılan tarama testini ve ardından kombine disk (KD) yöntemi ile doğrulamayı önermektedir¹⁰. Bu bakteriler için çift disk sinerji (ÇDS) ve Epsilomer strip (E-test) yöntemleri de duyarlı birer yöntem olarak bildirilmiştir¹¹. E-test yönteminin diğer iki yöntemle göre maliyeti daha yüksektir¹². Genetik çeşitliliği oldukça fazla olan GSBL enzimlerinin moleküler yöntemlerle saptanması ise, zaman alan, maliyeti yüksek uygulamalar oldukları için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmamaktadır. GSBL ürettiği bilinen *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında GSBL varlığının saptanması amacıyla standart bir yöntem henüz tanımlanmamıştır^{11,13-15}.

Yukarda adı geçen çeşitli yöntemler kullanıldığında ortamdaki beta-laktam antibiyotiklerin *P.aeruginosa* ve *A.baumannii*'de kromozomal olarak bulunan klavulanik asite dirençli AmpC enzimlerinin sentezlenmesini indükleyebildiği ve klavulanik asitin GSBL enzimlerine olan inhibitör etkisini maskeleydiği ifade edilmektedir¹⁶. Bu çalışmada, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında GSBL varlığının saptanması amacıyla ÇDS, KD ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriler: Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde 2002-2004 yıllarında çeşitli servislerde takip edilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilmiş, seftazidim veya sefotaksim minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) değerleri 1 µg/ml üzerinde^{9,11} olan *P. aeruginosa* (n=38) ve *A. baumannii* (n=45) suşları dahil edildi. Suşlar -80°C'de saklandı. *K.pneumoniae* ATCC 700603 ve *E.coli* ATCC 25922 kalite kontrol suşları olarak kullanıldı.

Duyarlılık Testleri: Suşların seftazidim, sefotaksim ve sefepim MİK değerleri E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemiyle belirlendi, sonuçlar CLSI önerilerine göre değerlendirildi¹⁰.

GSBL Saptanması: Kanlı agara (%5 koyun kanı) pasajlanan bakterilerin bir gecelik inkübasyonu sonrasında hazırlanan taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri inokulumu hazırlandı, bu inokulum steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) içeren dört ayrı plağa homojen olarak sürüldü.

a) **ÇDS Yöntemi:** Bu amaçla amoksisilin-klavulanik asit (20+10 µg) diski plağın merkezine yerleştirildi. Etrafına her iki diskin merkezinden merkezine uzaklığı birinci plakta 18 mm, ikinci plakta 13 mm olacak şekilde seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), aztreonam (30 µg) ve sefepim (30 µg) (Oxoid,UK) diskleri yerleştirildi. Plaklar 35°C'da 18 saat inkübe edildi. Disklerin inhibisyon zonunda klavulanik asit yönünde genişleme olması veya indikatör antibiyotik diskleri ile klavulanik asit içeren disk arasında inhibisyon zonu oluşması GSBL varlığı yönünde yorumlandı¹¹.

b) **KD Yöntemi:** Seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30+10 µg) ve sefotaksim-klavulanik asit (30+10 µg) (Oxoid, U.K) diskleri üçüncü plağa yerleştirildi. Klavulanik asit içeren diskin inhibisyon zonunun diğer diskin inhibisyon zonundan 5 mm veya daha büyük olması GSBL varlığı yönünde yorumlandı¹⁰.

c) **E-test Yöntemi:** Suşların seftazidim, seftazidim-klavulanik asit, sefotaksim, sefotaksim-klavulanik asit MİK değerleri E-test stripleri ile belirlendi. Seftazidim/seftazidim-klavulanik asit ve sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit MİK değerlerinin oranının 8 veya daha fazla olması GSBL pozitif olarak yorumlandı¹¹. Seftazidimle birlikte sefotaksimin indikatör antibiyotik olarak kullanılmasının her üç yöntemde de duyarlılığı artırdığı bilindiği için bulgular bu şekilde hesaplanarak yöntemler kıyaslandı.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan 38 *P.aeruginosa* ve 45 *A.baumannii* suşunun izole edildiği klinik örneklerin dağılımı Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: Çalışmaya Alınan Suşların İzole Edildikleri Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

	Kan	Püvy	İdrar	BOS	BAL	DTA	Toplam
<i>P. aeruginosa</i>	15	11	8	1	3	–	38
<i>A. baumannii</i>	17	14	4	5	3	2	45

BOS: Beyin omurilik sıvısı, BAL: Bronkoalveolar lavaj, DTA: Derin trakeal aspirat,

P.aeruginosa izolatlarının duyarlılık yüzdeleri seftazidim, sefotaksim ve sefepim için sırasıyla %28.9, %2.6 ve %21 olarak saptanmıştır (Tablo II). Bu izolatların %78.9'u seftazidim/seftazidim+klavulanik asit, %21.1'i sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit oranının ≥ 8 olmasına göre E-test yöntemiyle GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. ÇDS yönteminde diskler arası mesafe 18 mm olacak şekilde test uygulandığında GSBL pozitiflik oranı %13.1, mesafe 13 mm olduğunda ise %31.5 olarak bulunmuştur. İzolatların 18 mm de pozitif bulunan hepsi 13 mm'de de pozitif sonuç verirken, 7 izolat sadece 13 mm'de pozitif sonuç vermiştir. İzolatların %5.2'si sadece sefepim ile pozitif bulunmuştur. KD yöntemiyle izolatların %84.2'si GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, E-test ile GSBL pozitif bulunan izolatların %26.3'ünde ÇDS yöntemiyle, %31.5'inde sefepim eklenmiş ÇDS yöntemiyle, %84.2'sinde KD yöntemiyle enzim varlığı tespit edilmiştir (Tablo III).

A.baumannii izolatlarının duyarlılık yüzdeleri seftazidim, sefotaksim ve sefepim için sırasıyla %13.3, %15.5, %26.6 olarak belirlenmiş (Tablo II), bu izolatların %93.3'ü seftazidim/seftazidim+klavulanik asit, %6.6'sı sefotaksim/sefotaksim+klavulanik asit oranına göre E-test yöntemiyle GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. ÇDS yönteminde diskler arası mesafe 18 mm olarak test edildiğinde hiçbir izolat pozitif bulunmazken, mesafe 13 mm olduğunda enzim varlığı %20 oranında saptanmıştır. İzolatların %8.9'u sadece sefepim ile pozitif sonuç vermiştir. KD yöntemiyle izolatların %53.2'si GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, E-test ile pozitif bulunan izolatların %11.1'inde ÇDS yöntemiyle, %20'sinde sefepim eklenmiş ÇDS yöntemiyle, %53.2'sinde KD yöntemiyle GSBL enziminin varlığı tespit edilmiştir (Tablo III).

Tablo II: *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* İzolatlarının Seftazidim, Sefotaksim ve Sefepime Duyarlılık Yüzdeleri ve MİK Aralıkları

Antibiyotik	<i>P. aeruginosa</i> (n: 38)		<i>A.baumannii</i> (n: 45)	
	MİK aralığı (µg/ml)	Duyarlılık (%)	MİK aralığı (µg/ml)	Duyarlılık (%)
TZ	0.5-256	28.9	0.5-256	13.3
CT	4-256	2.6	0.5-256	15.5
FEP	0.5-256	21.0	0.5-256	26.6

TZ: Seftazidim, CT: Sefotaksim, FEB: Sefepim.

Tablo III: *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* Suşlarında E-test, ÇDS ve KD Yöntemlerinin GSBL Varlığını Saptama Durumu

Test Yöntemi	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
	Pozitif Sayı/ Toplam Sayı (%)	Pozitif Sayı/ Toplam Sayı (%)
E-test (TZ/TZL ve CT/CTL ile)	38/38 (100.0)	45/45 (100.0)
ÇDS (18 mm ara ile)	5/38 (13.1)	0/45 (0)
ÇDS (13 mm ara ile, FEP yokluğunda)	10/38 (26.3)	5/45 (11.1)
ÇDS (13 mm ara ile, FEP varlığında)	12/38 (31.5)	9/45 (20.0)
KD (TZ-TZL ve CT-CTL ile)	32/38 (84.2)	24/45 (53.2)

TZ: Seftazidim, TZL: Seftazidim-klavulanik asit, CT: Sefotaksim, CTL: Sefotaksim-klavulanik asit, FEP Sefepim, ÇDS: Çift disk sinerji yöntemi, KD: Kombine disk yöntemi.

TARTIŞMA

İlk tespit edildiklerinde sadece *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinde varoldukları düşünülen GSBL grubu enzimler kısa sürede diğer Gram negatif bakterilerde de tespit edilmiştir^{1,11}. Kısa süre önce ülkemizden dokuz merkezin de katıldığı 51 Avrupa ülkesini kapsayan bir çalışmada, kandan izole edilen *P.aeruginosa* suşları için seftazidim direnci %29.4 olarak bildirilmiştir¹⁹. Bu çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* izolatlarının %28.9'u, *A.baumannii* izolatlarının ise %13.3'ü GSBL üretmelerine rağmen in vitro olarak seftazidime duyarlı bulunmuşlardır. Yine bir dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim duyarlılığı ise *P.aeruginosa*'da %21, *A.baumannii*'de ise %26.6 olarak saptanmıştır. Sefepim in vitro duyarlılık sonuçlarının,

kullanılan bakteriyel inokulümden belirgin bir şekilde etkilendiği gösterilmiş ve GSBL üreten *P.aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda tedavide uygun bir alternatif oluşturmayacağı bildirilmiştir²⁰. Gerek E-test gerekse KD yöntemlerinde seftazidimle birlikte sefotaksim indikatör antibiyotik olarak kullanılmasının daha önce belirtildiği gibi testin duyarlılığını artırdığı gözlenmiştir¹⁰.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, ÇDS yöntemi *P.aeruginosa* suşlarında GSBL'ların fenotipik olarak belirlenmesinde duyarlı bulunmamıştır²¹⁻²³. Bu çalışmada GSBL saptanması amacıyla ÇDS yöntemi kullanıldığında duyarlılığı artırdığı bildirilen iki yaklaşım denenmiştir. Klavulanik asit içeren disk ile diğer indikatör antibiyotikleri içeren diskler arasındaki mesafe yakınlaştırılmış ve teste AmpC türü enzimlere dirençli fakat GSBL'lar için uygun bir substrat oluşturan sefepim eklenmiştir²⁴⁻²⁶. Test sonucunda disklerin merkezden merkeze olan uzaklığını 18 mm'den 13 mm'ye azaltmak, pozitiflik oranını artırsa da enzim saptama oranı %30'u geçmemiştir. Bu çalışmada her iki bakteri grubundan toplam altı izolat ÇDS yönteminde sadece sefepim ile pozitif bulunmuştur. Önerilen metodlar ÇDS yönteminin duyarlılığını artırsa da E-test yöntemi kadar duyarlı bulunmamıştır. Bunun yanı sıra, ÇDS yöntemindeki gözlemimizle paralel olarak sefepim-klavulanik asit E-test stripinin GSBL'ların tanımlanmasında seftazidim-klavulanik asit ve sefotaksim-klavulanik içeren striplere göre daha başarılı bulunduğu belirtilmektedir²⁷.

Bu çalışmada KD yönteminin duyarlılığı, GSBL varlığının saptanmasında her iki cins bakteri için ÇDS yönteminden üstün bulunmuştur. Farklı enzimlerin farklı substrat profillerine sahip olması, testlerin sonuçlarındaki değişkenliğe yol açan temel faktörlerden biridir. PER-1 enzimleri seftazidimin yanı sıra sefotaksim ve aztreonama karşı yüksek hidrolitik aktivite gösterirken, TEM-4 ve OXA-17 gibi enzimler seftazidime karşı düşük afinite, sefotaksime karşı yüksek hidrolitik aktivite göstermektedir. GES tipi enzimler ise klavulanik asit inhibisyonuna dirençli bulunmuşlardır²⁸⁻³⁰. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ÇDS yönteminin sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, PSE tipi enzim üreten 162 *P.aeruginosa* izolatından sadece dördü ÇDS ile pozitif bulunmuştur³¹. Yapılan çalışmalarda klavulanik asit ile enzim inhibisyonu temeline dayanan testler özellikle VEB-1 ve PER-1 tipi enzimlerin tespitinde duyarlı bulunmuş, TEM ve SHV türevi enzimleri üreten izolatlar için sinerji görüntüsünü elde etmenin zor olduğu bildirilmiştir³². Fransa'da yapılan bir çalışmada, testin yapıldığı plağa AmpC tipi enzimleri inhibe edici özelliği olan oksasilin eklenmesinin duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir⁶.

Yapılan çalışmalar, *P.aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlarda uygunsuz antibiyotik tedavisinin mortaliteyi artıran bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir^{35,36}. Gerek *P.aeruginosa* gerekse *A.baumannii* izolatlarında bulunan GSBL enzimlerinin fenotipik olarak saptanması için kullanılacak testler standardize edilmemiştir; bu durum bu suşlarla enfekte hastalarda uygun tedavi verilme olasılığını azaltmaktadır. Moleküler yöntemlere dayalı testlerin kullanımı, enzim çeşitliliği, özel eğitilmiş personel ihtiyacı ve yüksek maliyet nedeniyle araştırma amaçlı çalışmalarla sınırlı kalmaktadır. KD yöntemi *P.aeruginosa* için E-test yöntemine yakın sonuç vermekle birlikte, gerek ÇDS gerekse KD yöntemleri E-test yöntemine oranla tüm GSBL'ları saptayamamıştır. Özellikle ÇDS yöntemi düşük maliyetine rağmen E-test yöntemine göre belirgin olarak yetersiz kalmıştır.

P.aeruginosa ve *A.baumannii* sadece GSBL üreterek değil aynı zamanda metallo beta-laktamazlar, kromozomal beta-laktamaz enzimleri, porin defekti ve hücre membran değişiklikleriyle de 3. veya 4. kuşak sefalosporinlere direnç kazanabilir. Bu nedenle bu izolatlar 3. veya 4. kuşak sefalosporinlere rutin antibiyogram testlerinin sonuçlarına göre dirençli olarak rapor edildiklerinde, GSBL saptamak için ek testler yapmanın pratik bir anlamı olmayacaktır. Fakat özellikle kritik hastalarda sonuçların duyarlı olarak rapor edilmesinden önce GSBL'ları göstermeye yönelik ek testlerin yapılması uygun tedavi planlarının oluşturulmasına katkıda bulunabilir. Bu çalışmada kullanılan fenotipik testler içinde yüksek maliyetine rağmen E-test yönteminin duyarlılığı diğerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, enzim tiplerinin moleküler analiz ile tanımlandığı çalışmalar ile desteklendiğinde Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları için önemli bilgilerin elde edilmesine yardımcı olacaktır.

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. Palucha A, Mikiewicz B, Gniadkowski M: Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1999, 43: 393-396.
3. Weiner J, Quinn JP, Bradford PA, et al: Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. JAMA 1999, 281: 517-523.
4. Sardan YC, Zarakolu P, Altun B, Yıldırım A, Yıldırım G, Haşçelik G, Uzun O: A cluster of nosocomial *Klebsiella oxytoca* bloodstream infections in a university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2004, 25: 878-882.
5. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P: A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother 2002, 49: 561-565.
6. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P: Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 2003, 41: 3542-3547.
7. Vahapoglu H, Ozturk R, Tansel O, et al: Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997, 41: 2265-2269.
8. Vahapoglu H, Coskuncan F, Tansel O, et al: Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 2001, 50: 642-645.
9. Sturenburg E, Mack D: Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003, 47: 273-295.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A7, 7th ed. 2000. NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
11. Livermore DM, Brown DF: Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001, 48 (Suppl 1): 59-64.
12. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM: Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E-test ESBL. J Antimicrob Chemother 2000, 45: 881-885.
13. Bush K: New beta-lactamases in Gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001, 32: 1085-1089.

14. Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995, 8: 557-584.
15. Essack SY: Laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)-the need for a reliable, reproducible method. Diagn Microbiol Infect Dis 2000, 37: 293-295.
16. Thomson KS: Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. Emerg Inf Dis 2001, 7: 333-336.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. 2004. Wayne, Pennsylvania.
18. White DJ, Sands RL: Storage of bacteria at -76 degrees C. Med Lab Sci 1985, 42: 289-290.
19. Unal S, Masterton R, Goossens H: Bacteraemia in Europe antimicrobial susceptibility data from the MYSTIC surveillance programme. Int J Antimicrob Agents 2004, 23: 155-163.
20. Mimoz O, Elhelali N, Léotard S, et al: Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1999, 44: 91-97.
21. Weldhagen GF, Prinsloo A: Molecular detection of GES-2 extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. Int J Antimicrob Agents 2004, 24: 35-38.
22. Aktas Z, Poirel L, Salcioglu M, et al: PER-1- and OXA-10-like beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. Clin Microbiol Infect 2005, 11: 193-198.
23. De Champs C, Poirel L, Bonnet R, et al: Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 3031-3034.
24. Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, et al: Evaluation of the Osiris Expert System for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2003, 41: 3712-3718.
25. Gottlieb T, Wolfson C: Comparison of the MICs of cefepime for extended- spectrum beta-lactamase producing and non-extended spectrum beta-lactamase producing strains of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother 2000, 46: 330-331.
- 26) Hancock REW, Bellido W: Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1992, 29 (Suppl A): 1-6.
27. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D: Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL E-test to detect extended spectrum beta-lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection. J Antimicrob Chemother 2004, 54: 134-138.
28. 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: 2385-2392.
29. Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Gollatz E: A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996, 40: 2488-2493.
30. Danel F, Hall LCM, Gur D, Livermore DM: OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999, 43: 1362-1366.
31. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N: Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 2002, 50: 11-18.
32. Kang CI, Kim SH, Park WB, et al: Bloodstream infections caused by antibiotic resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49: 760-766.
33. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH: *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49: 1306-1311.