

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE TİPLENDİRİLMESİ*

EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE TYPES IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES

Şafak ERMERTCAN¹, Mine HOŞGÖR LİMONCU¹, Hüseyin TAŞLI¹

ÖZET: Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerinin araştırılması ve tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Kan kültürlerinden izole edilen 32 *K.pneumoniae* suşunun antibiyotik duyarlılıkları belirlendikten sonra, çift disk sinerji testi ile 13 izolatta (%41) GSBL varlığı saptanmış, GSBL pozitif bulunan izolatların seftazidim, sefotaksim ve aztreonam minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri E-test ile belirlenmiştir. Suşlardan beta-laktamaz ekstraksiyonu yapılarak izoelektrik odaklama yöntemi ile enzimlerin tipleri araştırılmıştır. GSBL pozitif olan suşlardan birinde dört, birinde üç, altısında iki adet bant paterni gözlenirken, diğerlerinde birer adet bant paterni belirlenmiştir. GSBL pozitif 13 örnek için uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonuçlarına göre; 10 örnekte bla_{SHV}, altı örnekte bla_{TEM}, dört örnekte ise bla_{SHV} ve bla_{TEM} genleri birlikte saptanmıştır. PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemiyle 10 SHV enziminin GSBL tipinde olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarından ekstrakte edilen GSBL enzimlerinin tiplendirildiği bu çalışmada, izoelektrik noktaları, PCR ve RFLP sonuçları dikkate alındığında, enzim tiplerinin SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 olabileceği düşünülmüştür. Bu bilgiler ışığında hastane enfeksiyonlarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının GSBL üretebileceği göz önüne alınmalı ve tedavi protokolleri buna göre düzenlenmelidir.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*, beta laktamaz, kan kültürü.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate and type the extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood cultures. Following the detection of antibiotic susceptibilities in 32 *K.pneumoniae* isolates, ESBL were detected in 13 (41%) of them by using double disc synergy test. Minimum inhibition concentrations for ceftazidime, cefotaxime, and aztreonam of ESBL positive strains were determined by E-test. After the extraction of the enzymes, the types of ESBLs were investigated by isoelectric focusing method. It was seen that, of all ESBL positive strains, one strain had four bands, one had three bands, six strains had two bands, and each of the others had only one beta-lactamase band. The results of polymerase

*Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (2002/ECZ/005) olarak desteklenen bu çalışma, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (19-23 Eylül 2004, Kuşadası-Aydın) poster olarak sunulmuştur.

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (safak.ermertcan@ege.edu.tr)

chain reaction (PCR) revealed bla_{SHV} in ten samples, bla_{TEM} in six samples, and bla_{SHV} with bla_{TEM} in four samples. Ten SHV enzymes were typed as ESBL by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method. The results of isoelectric focusing, PCR and RFLP performed in these ESBL positive *K.pneumoniae* isolates showed that the ESBL types could be SHV-2, SHV-5 and SHV-12 in the tested strains. It should always be taken into consideration that *K.pneumoniae* isolates could produce ESBLs and antibiotic treatment protocols should be adjusted in accordance.

Key words: Klebsiella pneumoniae, beta lactamase, blood culture.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri, tüm dünyada yaygın olarak izole edilen beta-laktamazların en önemli grubunu oluştururlar. Plazmid kaynaklı beta-laktamazların sürekli büyüyen bir kolu olan GSBL'ler çoğunlukla hastane kökenli *Enterobacteriaceae* üyeleri tarafından eksprese edilirler. En sık *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında olmak üzere diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de saptanmaktadır^{1,2}. Bu enzimleri kodlayan genlerin hareketli elementler üzerinde yer alması nozokomiyal patojenler arasında yayılımlarını kolaylaştırmıştır^{3,4}.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, klinik izolatlarda GSBL enzimlerinin yüksek oranda saptandığı belirtilmiştir⁵⁻⁸. Son çalışmalara göre Türkiye, Avrupa ülkeleri içinde GSBL sıklığının en yüksek olduğu ilk üç ülke arasındadır⁹. GSBL'lerin, tüm dünyada hızla artması ve salgınlara, tedavi başarısızlığına ve mortalite oranlarının artmasına neden olması, doğru saptanmaları ve tiplendirilmelerini gerekli kılmaktadır. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında GSBL varlığının araştırılması ve saptanan GSBL enzimlerinin izoelektrik odaklama (IEF), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemleri ile tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çift disk sinerji testiyle GSBL varlığının saptanması: Kan kültürlerinden izole edilen 32 *K.pneumoniae* suşunun disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlendikten sonra çift disk sinerji testi (ÇDST) ile GSBL varlığı araştırıldı. Besiyesine McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonlarından yüzeyel ekim yapıldı. Besiyesinin merkezine amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski, çevresine de merkezden merkeze uzaklığı 25 mm olacak şekilde aztreonam (ATM), seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) diskleri yerleştirildi. 35°C'de bir gece inkübasyonun ardından CAZ, CTX ve ATM diskleri çevresindeki inhibisyon zonunda AMC diskiye doğru genişleme GSBL pozitifliği olarak değerlendirildi.

E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi: Bu amaçla *K.pneumoniae* izolatlarında CAZ, CTX ve ATM'nin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri araştırıldı. Hazırlanan 10⁸ CFU/mL bakteri süspansiyonlarından Mueller-Hinton (MH) agar besiyerine yüzeyel ekim yapıldı ve E-test şeritleri besiyerine yerleştirildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra suşların CAZ, CTX ve ATM MİK'leri değerlendirildi.

Beta-laktamazların izoelektrik noktalarının saptanması: Kanlı agar besiyerinde üreyen bakteri kültürlerinden 3-4 koloni alınarak 10 mL MH buyyon besiyerine ekildi, 35°C de 18 saat inkübe edildi. Bakteri süspansiyonları oda ısısında 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvılar atıldı. Çökeltilerin üzerine 5 mL 0.1 M fosfat tampon solüsyonu (phosphate buffer solution-PBS; pH: 7.0) eklenerek vortekslenildi ve tekrar santrifüj edildi. Üst sıvılar atılarak bu işlem iki kez tekrarlandı. Çökeltilerin üzerine 0.5 mL PBS konarak vortekslenildi, elde edilen süspansiyonlar ependorf tüplerine alındı. Beta-laktamazların hücre dışına çıkarılması amacıyla bakteriler sonikatörde (ELMA, Transsonic Digital) 15 dk. süre ile parçalandı, bu sırada enzimlerin sıcaktan etkilenmemesi için süspansiyon buz içinde tutuldu. Elde edilen sonikatlar 4°C'de 10000 devir/dk'da 2 dk. santrifüj edildi, beta-laktamazları içeren üst sıvılar ependorf tüplerine alınarak, tüpler -20°C'de saklandı.

Beta-laktamaz varlığının gösterilmesi: Bakterilerin sonikasyon işlemi sonrası elde edilen üst sıvılarından 5 µL alındı ve 5 µL nitrosefin solüsyonu (Oxoid) ile karıştırıldı, rengin 2 dk'dan az bir sürede sarıdan pembe-kırmızıya dönüşümü beta-laktamaz varlığı olarak değerlendirildi.

İzoelektrik odaklama yöntemi: Beta-laktamazların tiplendirilmesi IEF yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla amfolit (pH: 3-10, Sigma Chem. Co.) içeren poliakrilamid jel döküldükten sonra beta-laktamaz içeren bakteri sonikatlarından 25 µL alındı, 5 µL %50'lik gliserol ile karıştırıldı, bu karışımlardan 20 µL jeldeki çukurlara damlatıldı. Her jele ayrıca referans enzim olarak izoelektrik noktaları bilinen TEM-1 (pI: 5.4), OXA-1 (pI: 7.4), SHV-1 (pI: 7.6) ve IEF standart belirtecinden 5'er µL damlatıldı. Poliakrilamid jel IEF cihazında (111 Mini IEF, Bio-Rad) üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1.5 saat yürütüldü. Elektroforez işlemi bittikten sonra beta-laktamaz bantlarını görünür hale getirmek için jelin üzerine nitrosefin çözeltisi damlatıldı ve bagetle yayıldı. Kırmızı bantlar olarak belirginleşen beta-laktamaz bantlarının anoda olan uzaklıkları milimetrik kağıda işaretlendi ve fotoğrafları çekildi.

PCR ile bla_{TEM}, bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} beta-laktamaz genlerinin saptanması: DNA eldesi için bakterilerin bir gecelik katı besiyeri kültürlerinden iki koloni alınarak 200 µl distile su içinde 95°C'de 10 dk. bekletildi. Santrifüj (12.000 xg, 2 dk, 4°C) sonrası sıvı kısım toplandı. TEM, SHV ve CTX-M varlığı bilinen örnekler pozitif kontrol olarak kullanıldı.

TEM ve SHV PCR için; dNTP'ler 100 µM, primerler 20 pmol, CTX-M PCR için; dNTP'ler 200 µM, primerler 30 pmol ve tüm reaksiyonlar için MgCl₂ 1.5 mM, Taq polimeraz 1.25 U, DNA miktarı 5 µl ve toplam hacim 50 µl olacak şekilde içerik hazırlandı. 94°C'de 5 dk. ön denatürasyonu takiben 30'ar döngü olacak şekilde; TEM PCR için 94°C'de 1 dk. denatürasyon, 55°C'de 1 dk. birleşme, 72°C'de 1 dk. uzama, SHV PCR için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 68°C'de 30 sn. birleşme, 72°C'de 50 sn uzama, CTX-M PCR için 94°C'de 50 sn. denatürasyon, 50°C'de 40 sn birleşme, 72°C'de 60 sn. uzama ve tüm reaksiyonlar için 72°C'de 10 dk. son uzama koşulları uygulandı. Sonuçlar, agaroz jel elektroforezi-etidyum bromür yöntemi ile incelendi.

Tablo I. PCR'da Kullanılan Primer Setleri¹⁰⁻¹²

Primer		Dizi	Ürün Uzunluğu (baz çifti)
bla _{TEM}	TEM-F	5'-gaagacgaaagggcctcgtg-3'	1074 bp
	TEM-R	5'-ggctcgacagttaccaatgc-3'	
bla _{SHV}	SHV-F	5'-cgccgggtattcttattgtcgc-3'	1016 bp
	SHV-R	5'-tctttccgatgccgccagctca-3'	
bla _{CTX}	*CTX-MU1	5'-atgtgcagyaccagtaagt-3'	593-bp
	*CTX-MU2	5'-tgggtraartargsaccaga-3'	

* CTX-M PCR için tüm CTX gruplarını yakalayabilen ortak primer setleri.

SHV PCR ürünlerinin NheI restriksiyon enzimi ile kesilmesi: NheI enzimi SHV tipi GSBL'lerin çoğunluğunda, 238. aminoasit pozisyonunda Glisin→Serin değişimine sebep olan G→A baz değişikliğine özgüdür. Üç ünite enzim, enzimin kendi tamponu, 5 µL PCR ürünü ve distile su, reaksiyon hacmi 30 µL olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 2 saat 37°C'de bekletildikten sonra %1.5'lik agaroz jelde yürütüldü. 770 ve 247 bp uzunluğunda iki bant izlenmesi, SHV-1'den türev alan SHV tipi GSBL varlığı olarak değerlendirildi¹¹.

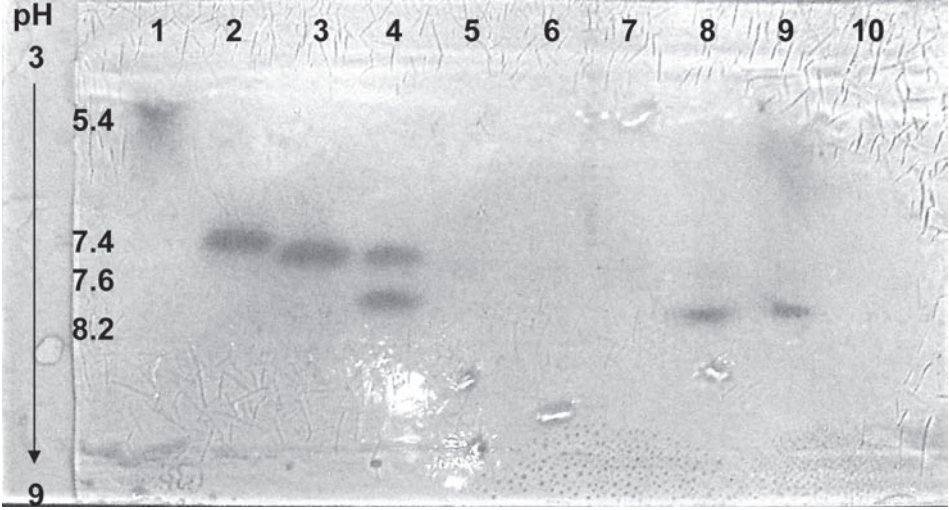
BULGULAR

Kan kültürlerinden izole edilen 32 *K.pneumoniae* suşunun 13'ünde (%41) GSBL varlığı saptanmıştır. GSBL pozitif bulunan suşların E-test ile belirlenen seftazidim, sefotaksim ve aztreonam MİK değerleri Tablo II'de verilmiştir. GSBL pozitif izolatların birinde 4, birinde 3, altısında 2 adet bant paterni gözlenirken, diğerlerinde birer adet bant paterni belirlenmiştir. İzoelektrik odaklamada en sık saptanan beta-laktamaz bantlarının pI 7.6 ve 8.2 olduğu gözlenmiştir (Tablo II) (Şekil 1).

Tablo II. GSBL saptanan *K. pneumoniae* suşlarının CAZ, CTX ve ATM için E-test ile belirlenen MİK değerleri, beta-laktamaz enzimlerinin izoelektrik noktaları ve PCR sonuçları

Suş No.	MİK Değerleri (µg/mL)			IEF (pI)	PCR			
	CAZ	CTX	ATM		TEM	CTX-M	SHV	Nhe I-res
1	6	0.5	6	5.4, 6.8, 8.2	+	-	+	+
2	64	16	64	8.3	-	-	+	+
3	64	24	64	5.4, 8.2	+	-	+	+
4	64	12	96	7.6, 8.2	-	-	+	+
5	16	3	256	7.6	-	-	+	+
6	128	8	64	7.1, 7.6, 8.4, 8.9	+	-	+	+
7	32	>32	6	8.4, 8.9	-	-	-	-
8	16	12	64	8.4	+	-	+	+
9	24	>32	12	8.2, 8.5	+	-	-	-
10	>256	>32	>256	8.5	+	-	-	-
11	1	16	24	8.5	-	-	+	+
12	32	4	24	7.6, 8.0	-	-	+	+
13	24	1	32	7.6, 8.1	-	-	+	+

CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim, ATM: Aztreonam.



Şekil 1. Bazı izolatların beta-laktamaz enzimlerinin IEF paternleri.

GSBL pozitif 13 örnek için uygulanan PCR sonuçlarına göre; 10 örnekte bla_{SHV} , 6 örnekte bla_{TEM} , 4 örnekte ise bla_{SHV} ve bla_{TEM} genleri birlikte saptanmıştır. Örneklerin hiçbirinde bla_{CTX} genine rastlanmamıştır. SHV pozitif PCR ürünlerinin NheI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda, 10 SHV enziminin GSBL tipinde olduğu gözlenmiştir (Tablo II).

TARTIŞMA

GSBL enzimlerinin tüm dünyada hızla artması ve ciddi klinik problemlere neden olmaları, sürekli araştırmalarını ve doğru tanımlanmalarını zorunlu kılmaktadır. Bugüne dek GSBL'ler en sık *K.pneumoniae* suşlarında saptanmış, bunu *E.coli* suşları izlemiştir. Ancak diğer enterik bakteriler de bu enzimleri sentezlemektedir¹³. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, GSBL'lerin yüksek oranda saptandığı görülmektedir. Bu çalışmaların sonuçları çeşitlilik göstermekle birlikte, GSBL üretiminin *E.coli* suşlarında %0-27, *K.pneumoniae* suşlarında ise %33-86 oranında saptandığı bildirilmektedir^{5,14-17}.

Geleneksel duyarlılık testlerindeki duyarlılık ve özgüllük problemi nedeniyle GSBL tanısında çok sayıda özel yöntem önerilmiştir. Bunlar arasında ÇDST ve Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) sıvı dilüsyon doğrulama testleri en kolay ve en ekonomik yöntemler olarak kabul görmektedir¹⁸. Bizim çalışmamızda, disk difüzyon ve CLSI GSBL tarama yöntemlerini takiben ÇDST ile GSBL varlığı araştırılmış ve GSBL pozitiflik kriterlerine uyan örneklerden 13'ü ÇDST ile pozitif bulunmuştur.

GSBL'lerin ilk belirlendiği dönemlerde izoelektrik noktanın tespit edilmesi var olan GSBL'leri göstermek için yeterli olsa da, günümüzde bu enzimlerin sayılarının artması ve çoğunun özdeş izoelektrik noktasına sahip olması nedeniyle bu testin yararı azalmıştır¹⁸. Çalışmamızın IEF bulguları, PCR sonuçları ışığında

anlamlılık kazanmış olup, SHV-PCR pozitif örneklerde GSBL tipi SHV enzimleri ile uyumlu bantlar gözlenmiştir (Tablo II). TEM-PCR pozitif altı örnekten ikisinde TEM ile uyumlu bant gözlenirken, diğerlerinde uyumlu bantlar görülmemesi, enzimin saptanacak düzeyde eksprese olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Tablo II). PCR sonuçlarına göre 6, 9 ve 10 no'lu örneklerde CTX-M ve SHV negatif bulunması ve izoelektrik noktalarının 8'in üzerinde olması başka tip GSBL'lerin varlığını düşündürmüştür. Bunun yanında bu örnekler için testler bir çok kez tekrar edilmiş olsa da PCR testlerinde bu izolatlara özgü bir inhibisyon olasılığı vardır ve buna bağlı olarak bir yalancı negatiflik söz konusu olabilir.

Günümüzde beta-laktamaz gruplarını veya tiplerini belirlemek için moleküler testler mutlaka gereklidir¹⁷⁻²³. Bunlar arasında PCR ve PCR tabanlı tiplendirme yöntemleri en sık kullanılanlardır. Bu çalışmada, enzime özgül PCR testlerine ek olarak, CTX enzimlerini gruplandırmak ve GSBL tipi SHV enzimlerini belirlemek için PCR-RFLP yönteminin kullanılması planlanmış, ancak CTX-PCR sonuçları negatif olduğundan sadece SHV pozitif örnekler için RFLP yöntemi uygulanmıştır. PCR sonuçlarına göre SHV pozitif 10 örneğin tamamının NheI restriksiyon enzimi ile kesim sonrası GSBL özelliğinde olduğu saptanmıştır. SHV tipi GSBL'lerin Türkiye dahil tüm dünyada özellikle *K.pneumoniae* suşlarında yaygın olduğu bilinmektedir. En yaygın enzim tipi ise SHV-2'dir. SHV-2 yanında ülkemizde SHV-5 ve SHV-12'nin de var olduğu yapılan moleküler çalışmalarla gösterilmiştir^{24,25}. Sonuç olarak, kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* suşlarından ekstrakte edilen GSBL enzimlerinin tiplendirildiği bu çalışmada, izoelektrik noktaları, PCR ve RFLP sonuçları dikkate alındığında, enzim tiplerinin SHV-2, SHV-5 ve SHV-12 olabileceği düşünülmüştür. Bu bilgiler ışığında hastane enfeksiyonlarından izole edilen *K.pneumoniae* suşlarının GSBL üretebileceği göz önüne alınmalı ve tedavi protokolleri buna göre düzenlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 361-4.
2. MacKenzie FM, Gould IM. Extended spectrum β -lactamases. J Infect 1998; 36: 255-8.
3. Jacoby GA. Extended-spectrum β -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- β -lactams. Infect Dis Clin North Am 1997; 11: 875-87.
4. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 309-18.
5. Gülay Z, Amyes SGB, Yuluğ N. Hastane enfeksiyonlarından soyutlanan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığının ve beta-laktamaz tiplerinin incelenmesi. Mikrobiyol Bül 1996; 30: 1-11.
6. Gültekin M, Ögünç D, Günseren F, Çolak D, Kırbaz İ, Mamikoğlu L. Hastane enfeksiyonu etkeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve antibiyotik duyarlılık özelliklerinin araştırılması. Enfeksiyon Derg 1999; 13: 515-20.
7. Ülkar Bahar ÜG, Tülek N, Mert A. Gram olumsuz basillerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında çift disk sinerji ve E-test yöntemleri. Enfeksiyon Derg 1999; 13: 385-90.
8. Gulay Z, Thomson CJ, Yulug N, Amyes SG. High prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at a University Hospital in Turkey. J Chemother 2000; 12: 145-52.

9. Gür D. β -laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33: 102-9.
10. Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 3737-41.
11. Nüesch-Inderbilen 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.
12. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, 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: 4264-9.
13. Nordmann P. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis 1998; 27: S100-S6.
14. Gur D, Gultekin M, Ogunç D, et al. Comparative in vitro activity of piperacillin-tazobactam against gram-negative nosocomial pathogens. 21st International Congress of Chemotherapy, 4-7 July, 1999. Birmingham, UK.
15. Garcia-Rodriguez JA, Jones RN and MYSTIC Programme Study Group. Antimicrobial resistance in gram-negative isolates from European intensive care units: data from the meropenem yearly susceptibility test information collection (MYSTIC) programme. J Chemother 2002; 14: 25-32.
16. Kocazeybek BS. Antimicrobial resistance surveillance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey. Evaluation of prevalence of extended-spectrum and inducible beta-lactamases using different E-test strips and direct induction methods. Chemother 2001; 47: 396-408.
17. Leblebicioglu H, Gunaydin M, Esen S, et al. Surveillance of antimicrobial resistance in gram-negative isolates from intensive care units in Turkey. J Chemother 2002; 14: 140-6.
18. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
19. Mabilat C, Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, pp: 553-9. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology. 1993. American Society for Microbiology, Washington DC.
20. Arlet GG, Bami D, Décrè A, et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. FEMS Microbiol Lett 1995; 134: 203-8.
21. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Characterization of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 85-9.
22. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). J Antimicrob Chemother 1996; 37: 797-802.
23. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Snelling AM, Hawkey PM. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 123-5.
24. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3554-60.
25. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 162-7.