

SEFOKSİTİNE DİRENÇLİ YA DA AZ DUYARLI SAPTANAN *KLEBSIELLA* SPP. VE *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA PLAZMİD ARACILI AmpC BETA-LAKTAMAZ ENZİM TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF PLASMID-MEDIATED AmpC BETA-LACTAMASE TYPES IN *KLEBSIELLA* SPP. AND *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES RESISTANT OR INTERMEDIATE TO CEFOXITIN

Hadiye DEMİRBAKAN¹, Kenan MİDİLLİ², Dilara ÖĞÜNÇ¹, Nevgün ÖZEN¹,
Gözde ÖNGÜT¹, Duygu DAĞLAR¹, Derya MUTLU¹, Betil ÖZHAK¹, Dilek ÇOLAK¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya. (dogunc@akdeniz.edu.tr)

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimleri giderek artan oranlarda bildirilmektedir. Plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimi üreten suşlarla enfekte hastalarda geniş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi başarısızlığı gözlenebilmektedir. Sunulan çalışmada, *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzimlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ocak 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen tüm klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan, 14'ü *Klebsiella* spp. ve 27'si *E.coli* olmak üzere toplam 41 klinik izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Fenotipik doğrulama testi olarak üç boyutlu test kullanılmıştır. İzoelektrik odaklama yöntemi ile izolatlarda bulunan beta-laktamaz enzimlerinin pI değerleri saptanmıştır. Plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile amplifiye edilmiş, Beckman Coulter CEQ 8000 cihazı kullanılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir. İki (%7.4) *E.coli* izolatında CMY-2 benzeri AmpC beta-laktamaz varlığı saptanmıştır. Bu suşların aynı zamanda CTX-M ve TEM tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz da ürettikleri belirlenmiştir. Aktarılabilen AmpC beta-laktamazlar çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle gram-negatif bakterilerde sınıf C beta-laktamazların saptanması, tedavide uygun antimikrobiyal seçiminde klinisyenleri yönlendirmesi açısından önemlidir.

Anahtar sözcükler: Plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.

ABSTRACT

Plasmid mediated AmpC beta-lactamases are reported from *Enterobacteriaceae* with increasing frequency. There have been reports of treatment failures in patients infected with these organisms and given broad-spectrum cephalosporins. The aim of this study was to investigate the presence of plasmid

mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. A total of 41 strains of cefoxitin resistant or intermediate *E.coli* (n= 27) and *Klebsiella* spp. (n= 14) were collected from January 2005 to January 2006 at Akdeniz University Hospital Central Laboratory. Three-dimensional test was used as a phenotypic confirmatory test. Analytical isoelectric focusing electrophoresis was used to measure the pI values of the beta-lactamases. Plasmid mediated AmpC enzyme genes were amplified using multiplex polymerase chain reaction and sequenced by Beckman Coulter CEQ 8000. AmpC beta-lactamases were only detected in two isolates (7.4%) of *E.coli*. These isolates produced CMY-2 like enzymes and have either CTX-M or TEM enzyme. Transferable AmpC beta-lactamases are associated with multiple antibiotic resistance. Therefore detection of these enzymes in gram-negative bacteria has a clinical importance, since it can often provide valuable information to clinicians leading to more effective and appropriate use of antimicrobials.

Key words: Plasmid mediated AmpC beta-lactamases, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.

GİRİŞ

Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazları *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* gibi gram-negatif bakterilerin kromozomal AmpC genlerinden köken alan sefalosporinazlardır. AmpC beta-laktamazları genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)'dan farklı olarak beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli olup sefamisinleri hidroliz eder¹. Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazları köken aldıkları bakteriye göre dört ana gruba ayrılmaktadır. Grup 1'de yer alan BIL-1, CMY-2, LAT-1 ve LAT-2 enzimleri *C.frendii*, Grup 2'de yer alan MIR-1 ve ACT-1 enzimleri *E.cloacae*, Grup 3'te yer alan CMY-1, FOX-1 ve MOX-1 ile Grup 4'te bulunan CMY "cluster" enzimleri *Pseudomonas aeruginosa*'nın kromozomal enzimleri ile yakın ilişkilidir¹. *K.pneumoniae*, *E.aerogenes*, *S.enterica* serotip Enteritidis ve serotip Senftenberg, *E.coli*, *P.mirabilis*, *M.morganii* ve *K.oxytoca*'da plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlarının varlığı saptanmıştır¹.

Plazmid aracılı AmpC enzimi taşıyan bakteriler genellikle geniş spektrumlu penisilinler, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, monobaktam ve sefamisinlere dirençli iken sefepim, sefpirom ve karbapenemlere duyarlıdır. Bu enzimi taşıyan bakterilerle oluşan enfeksiyonlarda, GSBL üreten bakterilerle oluşan enfeksiyonlara benzer şekilde genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi başarısızlığı, yüksek mortalite gibi ciddi klinik sorunlarla karşılaşabilmektedir². AmpC beta-laktamazların saptanmasında "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen bir tarama ve doğrulama testi bulunmamasıyla birlikte farklı çalışmalarda, bu enzimlerin saptanmasında kullanılabilecek çeşitli tarama ve doğrulama testleri önerilmektedir³. Prevalansının artması, plazmid aracılı çoklu ilaç direnci taşıyan bakterilerle salgınların oluşabilmesi ve geniş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi başarısızlığına yol açabilmesi gibi nedenlerden dolayı plazmid aracılı AmpC beta-laktamazların saptanması gerekli olmaktadır³. Sunulan çalışmada, *Klebsiella* spp. ve *E.coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Ocak 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen tüm klinik örneklerden izole edilen 502'si *Klebsiella* spp., 1398'i *E.coli* olmak üzere toplam 1900 klinik izolatın sefoksitin duyarlılığı disk difüzyon

yöntemi ile CLSI'nın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan, 14'ü *Klebsiella* spp. ve 27'si *E.coli* olmak üzere toplam 41 klinik izolat çalışmaya dahil edildi.

Suşların tümüne fenotipik doğrulama testi olan üç boyutlu test uygulandı. Üç boyutlu test sonucu pozitif bulunan suşlarda multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz varlığı araştırıldı. Multipleks PCR ile pozitif saptanan suşlarda "family specific" öncüllerin kullanıldığı PCR testi ve DNA dizi analizi yapılarak enzim üretimi doğrulandı. Plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimi saptanan suşlarda kombinasyon disk testi uygulanarak GSBL varlığı araştırıldı ve izoelektrik odaklama yöntemi ile beta-laktamaz enzimlerinin izoelektrik odak noktaları belirlendi. Kombinasyon disk testi pozitif saptanan suşlarda PCR ile *blaTEM*, *blaSHV* ve *blaCTX-M* beta-laktamaz genlerinin varlığı araştırıldı.

Üç Boyutlu Test

Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan suşlara, Coudron ve arkadaşlarının⁴ önerileri doğrultusunda üç boyutlu test yöntemi uygulandı. Bakterilerin kanlı agar besiyerinde bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0.5 McFarland'a ayarlanmış süspansiyonları Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek 4 saat 35°C'lik etüvde bekletildi. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözülürülerek enzim ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Standart disk difüzyon testi için Mueller-Hinton agara ATCC 25922 *E.coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konuldu. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açıldı ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µl elde edilen enzimlerden konuldu. Petriler 35°C'lik etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan ≥ 3 mm distorsiyona neden olanlar "üç boyutlu test pozitif" olarak kabul edildi.

İzoelektrik Odaklama

Beta-laktamazların izoelektrik noktalarını (pI) belirlemek amacıyla "Model 111 Mini IEF Cell" cihazı (Biorad, Hercules, Kaliforniya) kullanıldı. pI, protein belirteci IEF Standart 4.45-9.6 ile karşılaştırılarak saptandı. pI 6.4-9.4 arasında olup, plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamazlarla uyumlu olduğu düşünülen ürünlerle, pI TEM (pI 5.2-6.5), SHV (pI 7-8.2), CTX-M (pI 7.9-8.6) türevi GSBL'lerle uyumlu bulunan ürünler tarayıcı yardımıyla görüntülendi^{2,5}.

GSBL Kombinasyon Disk Testi

Seftazidim ve sefotaksim zon çaplarında, klavulanik asit ile test edildiklerinde, tek başına test edilmelerine göre ≥ 5 mm artış görülmesi GSBL pozitifliği olarak değerlendirildi⁶. Pozitif saptanan suşlarda PCR ile *blaTEM* (5'-gagtattcaacatttccgtg-3', 5'-taattcagtgaggcacctatctc-3'), *blaSHV* (5'-cgccgggtatttctattgtcgc-3', 5'-tcttccgatgccgccgagtcac-3') ve *blaCTX-M* (5'-cgctttgcgatgtgcag-3', 5'-acggcgatatcgttggt-3') primerleri kullanılarak beta-laktamaz genlerinin varlığı araştırıldı. Kontrol suşu olarak *K.pneumoniae* ATCC 700603 kullanıldı.

Multipleks PCR

Plazmid kaynaklı AmpC enzimlerini saptamak amacıyla Perez-Perez ve arkadaşlarının⁷ tanımladığı öncüller ve PCR koşulları kullanıldı. Pozitif suşlar Li ve arkadaşlarının⁸ tanımladığı “family specific” öncüller ve PCR koşulları kullanılarak tekrarlandı.

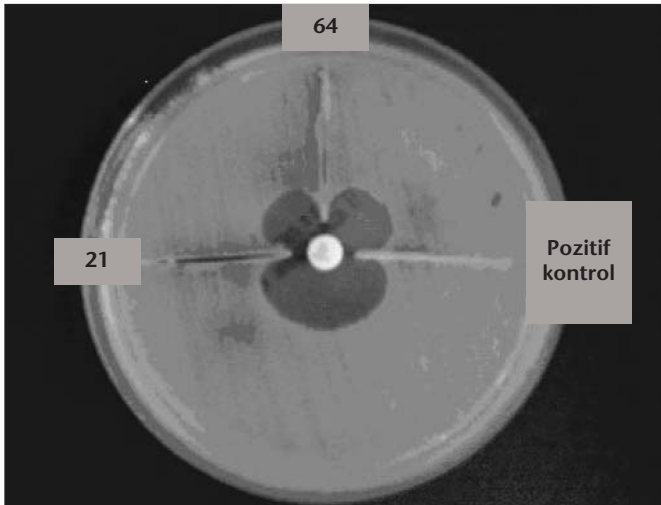
DNA Dizi Analizi

Daha önceki PCR sonucu pozitif olarak belirlenen izolatların *bla*CMY-1, *bla*CMY, *bla*-MOX, *bla*FOX, *bla*BIL, *bla*LAT, *bla*ACT, *bla*MIR, *bla*AmpC[C] ve *bla*AmpC[E] allelleri ile uyum gösteren DNA dizilerini belirlemek için, Li ve arkadaşlarının⁸ tanımladığı öncüllerle yapılan PCR sonucu elde edilen ürünler kullanıldı. Dizileme reaksiyonu için, PCR sonucu pozitif olarak belirlenen suşların PCR ürünleri, DNA saflaştırma kiti (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldı. Beckman Coulter CEQ 8000 cihazı kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi.

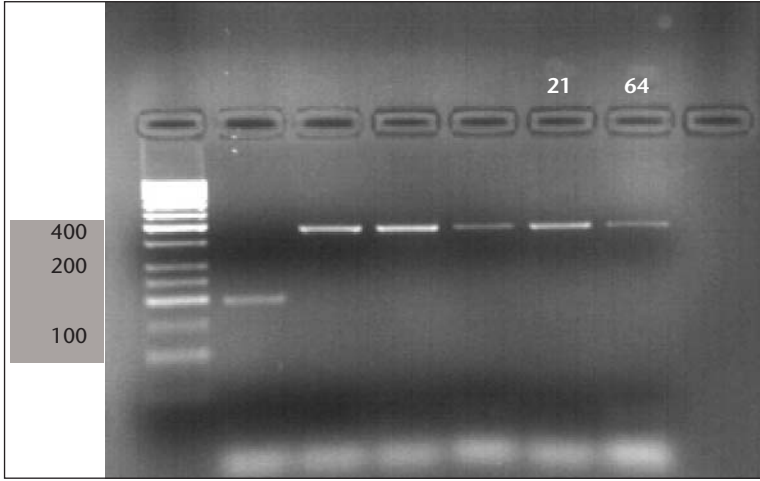
Çalışmada, FOX-3, CMY-6, LAT-1 ve CMY-2 pozitif kontrol suşları kullanıldı.

BULGULAR

Disk difüzyon testi ile *Klebsiella* spp. suşlarının 7’sinde sefoksitin direnci saptanırken, 7’sinde sefoksitine azalmış duyarlılık bulunmuştur. Yirmi yedi *E.coli* suşunun 5’i sefoksitine dirençli, 22’si ise azalmış duyarlılıkta tespit edilmiştir. Üç boyutlu test, toplam 7 izolatla (5 *E.coli*, 1 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*) pozitif sonuç vermiştir (Resim 1). Pozitif bulunan bu izolatlardan 2 *E.coli* suşunun CMY-2 benzeri enzim ürettiği belirlenmiştir (Resim 2). GSBL kombinasyon disk testleri de pozitif olan bu suşların pl değerleri incelendiğinde, hem AmpC beta-laktamazlarla uyumlu, hem de TEM veya CTX-M beta-laktamazları ile uyumlu bantların olduğu gözlenmiştir. PCR ile bu suşlardan birinin CTX-M, diğerinin TEM tipi GSBL ürettikleri belirlenmiştir.



Resim 1. CMY-2 benzeri enzim salgıladığı belirlenen *E.coli* suşlarının (no 21 ve no 64) üç boyutlu test sonucu oluşturdıkları distorsiyonların görüntüleri.



Resim 2. Multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.

Çalışmamızda sefoksitine azalmış duyarlılık gösteren veya dirençli bulunan 27 *E.coli* izolatının 2 (%7.4)'sinde CMY-2 benzeri enzim saptanırken, *Klebsiella* spp. suşlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim üretimi saptanmamıştır.

TARTIŞMA

İlk kez 1983 yılında GSBL üreten *K.pneumoniae* suşunun saptanmasından bugüne, *Enterobacteriaceae* ailesi içinde GSBL üretimine bağlı antibiyotiklere dirençli suşların sıklığında belirgin artış gözlenmiştir. Son 15 yılda enterik bakterilerde plazmid aracılı AmpC enzimlerinin varlığı ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Plazmid aracılı AmpC enzimi üreten suşlarla, nozokomiyal salgınlar oluşabileceği gibi, bu enzimi taşıyan suşlarla enfekte hastalarda GSBL üreten suşlarla oluşan enfeksiyonlarda olduğu gibi sefalosporinlerle tedavi başarısızlığı ve mortalitede artış görülebilmektedir².

Çalışmamızda sefoksitine azalmış duyarlılık gösteren veya dirençli bulunan 27 *E.coli* izolatının 2 (%7.4)'sinde CMY-2 benzeri plazmid kaynaklı AmpC enzimi saptanırken, *Klebsiella* suşlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim üretimi saptanmamıştır. Tüm suşlar arasında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzimi sıklığı %0.1; *E.coli* suşlarında ise %0.14 olarak bulunmuştur.

Li ve arkadaşları⁸, 2003-2005 yılları arasında Çin'de bir üniversite hastanesinde *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli* suşlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim prevalansını %2.79 olarak belirlemişlerdir. Türlerle göre plazmid kaynaklı AmpC sıklığı ve içerdikleri enzimler; *K.pneumoniae*'de %4.3 (29 DHA-1, 1 CMY-2), *E.coli*'de %1.9 (11 DHA-1, 12 CMY-2), *K.oxytoca*'da %3 (1 DHA-1) olarak saptanmıştır. DHA-1 enzimi ise en sık saptanan plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzimi olarak bulunmuştur. Kore'de bir üniversite hastanesinde 2002-2004 yılları arasında *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. ve *Proteus mirabilis* klinik izolatları arasında plazmid kaynaklı AmpC prevalansının araştırıldığı çalışmada, DHA-1 enziminin en sık saptanan enzim olduğu ve yıllara göre *K.pneumo-*

niae izolatlarında bu enzimin görülme sıklığının arttığı saptanmıştır. Türlerle göre plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz oranları *K.pneumoniae*'de %2.9, *K.oxytoca*'da %2.5, *Salmonella* spp.'de %0.8 olarak bulunurken, *P.mirabilis*'te plazmid kaynaklı AmpC enzimi saptanmamıştır⁹. Amerika'da Alverez ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında, seftazidim dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim sıklığı %8.5 (*K.oxytoca*'da %6.9, *E.coli*'de %4), İsviçre'de Adler ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasında ise %0.16 olarak bulunmuştur. Brezilya'da bir üniversite hastanesinde yapılan çalışmada ise, çoklu ilaç direnci gösteren enterik bakterilerde plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz enzim varlığı saptanmamıştır¹².

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, 1995 yılında Bal ve arkadaşları¹³ *K.pneumoniae* suşlarında CMY-2 enzim varlığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da sefoksitine dirençli 29 *E.coli* suşunun 3 (%10.3)'ünde ve 71 *K.pneumoniae* suşunun 7 (%9.85)'inde plazmid kökenli AmpC saptanmıştır¹⁴. Çalışmamızda, plazmid aracılı AmpC enzimi üreten iki *E.coli* izolatında, eş zamanlı olarak CTX-M ve TEM tipi GSBL enzim varlığı saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; Yan ve arkadaşları¹⁵ Tayvan'da yaptıkları bir çalışmada, plazmid aracılı AmpC enzimi ile birlikte GSBL üreten suşların varlığına dikkat çekmişler; Song¹⁶ ve arkadaşları ise plazmid aracılı AmpC enzimi üreten 46 izolatın %8.7'sinde aynı zamanda GSBL enzimi saptandığını bildirmişlerdir. GSBL ile birlikte plazmid aracılı AmpC enzimi üreten suşlarda, AmpC varlığı GSBL doğrulama testi ile GSBL enzimlerinin saptanmasını maskeleyebilmektedir.

Sonuç olarak, hastanemizde *Klebsiella* spp. ve *E.coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz sıklığının düşük olduğu saptanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda bildirildiği gibi, plazmid aracılı AmpC enzimlerinin sıklığında zaman içinde artış olabileceği göz önüne alınırsa, ileride dirençli suşların yayılımı ile ortaya çıkabilecek tedavi sorunlarının engellenmesi açısından plazmid aracılı AmpC enzimi üreten suşların belirlenmesi gidecek önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Rice LB. Mechanisms of resistance to antibacterial agents, pp: 1114-45. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
2. Pai H, Kang CI, Byeon JH, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3720-8.
3. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid mediated class C β-lactamases. Int J Infect Dis 2007; 11: 191-7.
4. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol 2000; 38: 1791-6.
5. Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88: 169-78.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 18th Informational Supplement. Document M100-S18. 2008, CLSI, Wayne, PA.
7. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2153-62.
8. Li Y, Li Q, Du Y, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. J Clin Microbiol 2008; 46: 1317-21.

9. Song W, Kim JS, Kim HS, et al. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 219-24.
10. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 533-7.
11. Adler H, Fenner L, Walter P, et al. Plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 457-8.
12. da Silva Dias RC, Borges-Neto AA, D'Almeida Ferraiuoli GI, et al. Prevalence of AmpC and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 79-87.
13. Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın A, Ang Ö. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik sefamisinaz CMY-2. *İnfeksiyon Derg* 1995; 9: 67.
14. Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar; özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi, s: 45-69. Ulusoy S (ed), *Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi*. 2005, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
15. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1861-4.
16. Song W, Jeong S, Kim J, et al. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 315-8.