

GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE ANTİBAKTERİYAL DİRENCİN FENOTİPİK YÖNTEMLER İLE TAYİN VE BİLDİRİMİ

Duygu ÖCAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

İn-vitro olarak antibiyotik duyarlılık testleri, bakteriyel patojenin bir antibiyotiğin tedavisi sırasında ulaşılan in-vivo düzeylerine duyarlı olup olmadığı değerlendirilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Rutin duyarlılık testlerinde bazı direnç mekanizmaları gözden kaçabilmekte; bu gibi durumlarda bazı ek testler gerekebilmektedir. Uygulanan ek testler sayesinde antibiyotiğe karşı oluşmuş direnç mekanizması tahmin edilebilir. Bu testler ayrıca direnç mekanizmasından etkilenen diğer antibiyotiklerin duyarlılıklarını saptamada yol gösterir. Duyarlılık testlerinin standart bir yöntemle uygulanması, sonuçlarının yorumlanması ve uygun raporlanması ile tedavi başarısızlıkları en aza indirilebilmektedir.

Bu derlemede Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tarama ve tanı testleri ile bildirimleri, AmpC beta-laktamaz tanı testleri ve karbapenemazların tarama, tanı testleri ve bildirimi üzerine güncel bilgiler sunulmuştur.

Anahtar sözcükler: AmpC beta-laktamaz, Gram negatif bakteri, GSBL, karbapenemaz

SUMMARY

Detection and Reporting of Antibacterial Resistance Using Phenotypic Methods in Gram Negative Bacteria

In vitro antibiotic susceptibility testing is applied in order to determine whether the bacterial pathogens are sensitive to the in vivo levels that were achieved during treatment. In routine susceptibility tests, some resistance mechanisms may not be noticed; some additional tests may be needed in such cases. The resistance mechanisms can be estimated through additional tests. These tests indicate how to determine the sensitivity of the other antibiotic that are affected by the resistance mechanisms. Treatment failures can be reduced by a standard method implementation of the susceptibility tests, interpretation and appropriate reporting of the results. The interpretation and reporting of the antibiotic susceptibility results is the task of the clinical microbiology specialist who made the tests.

In this review, current information about the screening, detection and reporting of extended-spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and carbapenemases in Gram negative bacteria are presented.

Keywords: AmpC beta-lactamase, carbapenemase, ESBL, Gram negative bacteria

Günümüzde antibiyotik direnci önemli bir halk sağlığı sorunudur. Antibakteriyel direnç, farklı mekanizmalar ile gelişebilir. Bazı mikroorganizmalar birkaç mekanizmayı barındırarak birden çok ilaca dirençli olma potansiyeli taşırlar. Birden çok ilaca dirençli Gram negatif enterik bakterilerin oluşması hem nozokomiyal, hem toplumdaki kazanılan infeksiyonların yönetiminde büyük bir problem oluşturmaktadır⁽³¹⁾.

Beta-laktam antibiyotiklerin ve bu antibi-

yotiklerin inhibitör kombinasyonlarının sık kullanımı var olan direnç mekanizmalarını arttırmakla birlikte yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına da neden olmaktadır. Sonuçta artan tedavi zorlukları ile karşı karşıya kalınmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının, önerilen standart yöntemlerle araştırılması ve direnç oranlarının güvenilir ve çabuk saptanması son derece önemlidir. *Enterobacteria-*

İletişim adresi: Duygu Öcal. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel: (0312) 595 81 37, GSM: (0506) 621 48 51

e-posta: drduygunil@hotmail.com

Alındığı tarih: 13.02.2012; yayına kabul: 11.07.2012

ceae suşlarının ürettiği beta-laktamazlar, AmpC enzimleri nedeniyle bu etkenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde seçenek olarak çıkan antibiyotiklerden birisi karbapenemlerdir. Karbapenemler, ciddi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında ilk seçilen ajanlardır. Bu durum ise yavaş yavaş beta-laktamazların yayılımını arttırmaktadır. Dolayısıyla tedavi öncesi hızlı ve güvenilir tanısal testler gereklidir⁽³¹⁾.

Bu derlemede GSBL, AmpC beta-laktamazların ve karbapenemazların tarama ve tanı testlerinden bahsedilecektir. Ayrıca saptanan bu dirençlerin raporlanmasında, 2011 yılında yayınlanmış olan Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri dikkate alınarak genel bilgiler verilmiştir.

I. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)

Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç üç yolla gelişmektedir. Bunlar; penisilin bağlayan proteinlerde oluşan değişiklikler ile antibiyotğin bağlanmasının engellenmesi, dış membran proteinlerinde oluşan değişiklikler ile ilacın hücre içine girişinin önlenmesi ve beta-laktamaz

enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi olarak sıralanabilir⁽¹⁷⁾.

Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hâle getiren beta-laktamaz enzim üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır⁽¹⁾. Beta-laktamazlar genellikle iki genel şemaya göre sınıflandırılırlar: Ambler moleküler sınıflandırma ve Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırma. Ambler sınıflandırması, enzimleri moleküler homolojilerine uygun olarak dört gruba ayırır. Bunlar; sınıf A, C ve D serin beta-laktamazlar ve sınıf B metallo-beta-laktamazlardır (MBL)^(2,17,20). Bush-Jacoby-Medeiros ise beta-laktamazları, antimikrobiyal substrat profil spektrumu, enzim inhibisyon profili, enzimin net yükü ve protein molekül ağırlığı gibi biyokimyasal özelliklerine göre dört gruba ayırır; Grup 1 sefalosporinazlar klavulanik asitle iyi inhibe olmazken, Grup 2'deki beta-laktamazlar tam inhibe olurlar, Grup 3'te yer alan MBL'ler etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve p-kloramotribenzoat hariç, beta-laktamaz inhibitörleriyle zayıf inhibe olur, Grup 4'tekiler ise beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmazlar^(4,6). Tablo 1'de beta-laktamaz grupları ve

Tablo 1. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri.

Beta-laktamaz	Molekül sınıfı	Tercih edilen substrat	CA ^a	Örnek enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri; MIR-1
2a	A	Penisilinler	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	+	TEM-3 ile TEM 26, SHV-2 ile SHV-6, Klebsiella oxytoca K1
2br	A	Penisilinler	+/-	TEM-30 ile TEM-36, TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	+	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	+/-	OXA-1 ile OXA-11, PSE-2 (OXA -10)
2e	A	Sefalosporinler	+	Proteus vulgaris'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	+	Enterobacter cloacae'nin NMC-A'sı, Serratia marcescens'in Sme-1'i
3	B	Birçok beta-laktam (karbapenemler dâhil)	-	Stenotrophomonas maltophilia'nın L-1'i, Bacteroides fragilis'in CcrA'sı
4	ND ^b	Penisilinler	-	Pseudomonas cepacia'nun penisilinazı

^aCA: Klavulanik asit, ^bND: Belirlenmemiş.

genel özellikleri izlenmektedir⁽⁶⁾.

Enterobacteriaceae ve *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan ve "yeni beta-laktamazlar" olarak adlandırılan plazmid kaynaklı sefamisinazlar, GSBL ve karbapenemleri hidrolize eden enzimler (karbapenemazlar) son yıllarda öne çıkmaya başlamıştır. 1980'lerden sonra geniş spektrumlu beta-laktamazların yoğun şekilde kullanıma girmesiyle penisilin ve sefuroksim, sefotaksim, seftazidim gibi oksiminosefalosporinlere direnç sağlayan enzimler bulunmuş ve etki spektrumlarıyla paralel olarak bu enzimlere GSBL denmiştir. Bu enzimler klasik beta-laktamaz inhibitörleri (sulbaktam, klavulanik asit, tazobaktam) ile inhibe edilir. GSBL enzimleri arasında en sık görülenleri Ambler sınıf A'da bulunan plazmid kökenli TEM, SHV, CTX-M grubu enzimler ile Ambler sınıf D'de bulunan OXA grubu enzimlerdir. Önceleri TEM ve SHV grubu enzimler tüm dünyada yaygın iken, şimdilerde CTX-M tipi daha yaygındır⁽²⁹⁾. CTX-M 15 tüm dünyada en yaygın olan tip olmakla birlikte, CTX-M'nin farklı varyantları, farklı ülkelerde daha baskın görülebilmektedir. Enzim tipleri veya suşa bağlı olmadan *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri dünyanın bazı yerlerinde birden çok ilaca dirençli olabilirler. Bu da ampirik tedavilerin başarısızlık oranını arttırabilir^(4,10,32). Bunların dışında yine plazmidlerle kodlanan PER-1, PER-2, TOHO-1, VEB-1 gibi yeni tanımlanan enzimlerle birlikte GSBL enzimlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır⁽⁴⁾.

GSBL tespitinin önemli olduğunu vurgulayan bir çalışmada GSBL pozitif *Escherichia coli* ile oluşan infeksiyonlarda mortalite oranı (% 24.3), GSBL negatif *E.coli* ile oluşan infeksiyonlardaki mortalite oranına (% 8) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur⁽⁸⁾.

GSBL'ler kromozomal olarak kodlanabildiği gibi plazmid ve transpozonlar üzerinde de bulunabilir. Plazmid ve transpozonlar üzerinde bulunan GSBL'ler kolayca yayılabilmektedir. Geniş spektrumlu sefalosporinlerin kullanımının seçicilik özelliği de, bu yayılımı arttırmaktadır. GSBL'leri içeren büyük plazmidler, diğer antibiyotiklere (trimetoprim/sulfametoksazol, aminoglikozidler, florokinolonlar gibi) direnç genlerini de taşıyarak çoklu ilaç direnç özelliği

gösterebilirler^(10,29).

GSBL en sık *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli*'de bulunur. GSBL 1980-1990 yılları arasında *K.pneumoniae*'de baskın iken, 2000'li yıllarda *E.coli*'de de giderek artarak saptanmaya, hatta öne geçmeye başlamıştır. GSBL üreten *Klebsiella* türleri genelde nozokomiyal infeksiyonlardan izole edilirken, *E.coli* daha sıklıkla toplum kökenli infeksiyonlarda görülmektedir⁽³⁰⁾. Diğer Gram negatif bakterilerde de (*Enterobacter* spp., *P.aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* ve *Serratia marcescens*) GSBL üretimi saptanmaktadır⁽¹⁰⁾.

GSBL tayini hem fenotipik hem genotipik olarak yapılabilmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutinde fenotipik yöntemler kullanılırken, araştırma veya referans laboratuvarlarında genotipik yöntemler de kullanılmaktadır. 2011 yılında yayınlanan CLSI'da GSBL tayininin uygulanması rutin olarak önerilmemektedir. Epidemiyolojik ya da infeksiyon kontrol amacıyla GSBL tespitinin yararlı olabileceği vurgulanmıştır⁽⁷⁾. GSBL tayininde tarama ve doğrulama testleri kullanılmaktadır. Tarama testi olarak disk difüzyon tarama testi kullanılabilir.

GSBL'nin laboratuvar tanısı

a) Tarama testleri

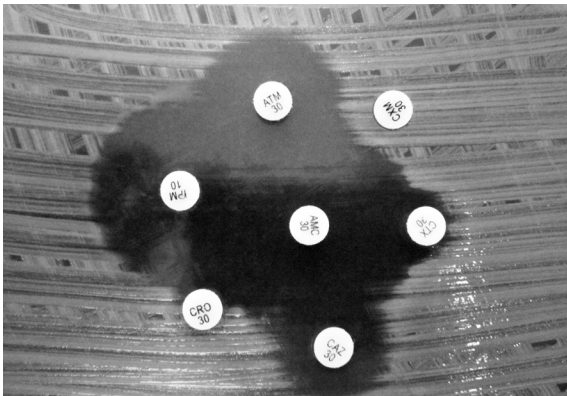
Disk difüzyon tarama testi (DDTT): DDTT ile GSBL varlığının saptanmasında test edilecek bakteri 0.5 McFarland standardına göre hazırlanır. Bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine sürüntü ekimi yapılır ve sefpodoksime (30 µg), seftazidime (30 µg), sefotaksime (30 µg), seftriaksona (30 µg) veya aztreonama (30 µg) diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra antibiyotik zon çapları ölçülür. *K.pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E.coli* için seftazidim ≤ 22 mm, seftriakson ≤ 25 mm, sefotaksim ≤ 27 mm, sefpodoksime ≤ 17 mm, aztreonam ≤ 27 mm olması; *Proteus mirabilis* için ise sefpodoksime ≤ 22 mm, seftazidime ≤ 22 mm, sefotaksim ≤ 27 mm olması durumunda GSBL tarama testi pozitif kabul edilerek doğrulama testi uygulanır⁽⁷⁾.

b) Doğrulama testleri

Klavulanik asidin GSBL enzimlerinin akti-

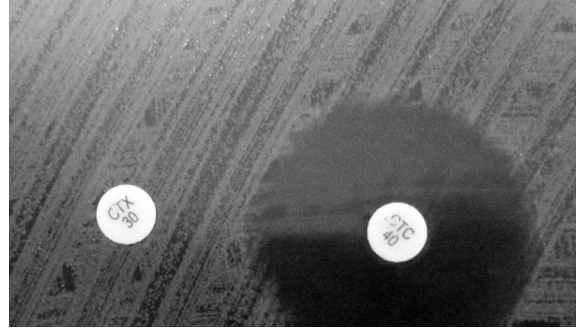
vitesini inhibe etmesi temeline dayanır. Bu amaçla çift disk sinerji testi, kombine (modifiye) disk sinerji testi, E-test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi veya üç boyutlu test uygulanabilir ya da otomatize sistemler kullanılır.

Çift disk sinerji testi (ÇDST): Bu yöntemde 0.5 McFarland standardına uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonundan MHA besiyerine eküvyonla sürüntü ekimi yapılır. Besiyeri plağının tam ortasına amoksisilin-klavulanik asit diski (20/10 µg) ile etrafına disk merkezleri arasındaki uzaklık 25 mm olacak şekilde seftazidim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefotaksim (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg) diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, sefalosporinlerin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskiye doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını, aksi durum ise GSBL negatif olduğunu göstermektedir. İnhibisyon zonu oluşmadığında veya küçük zon oluştuğunda disk arası uzaklık 20 mm'ye düşürülebilir. Diskler arası uzaklığın 20 mm'ye düşürülmesi ile klavulanat sinerjisi görülme oranı yükselmektedir. Çok geniş zon çapları oluştuğunda ise diskler arası uzaklık 30 mm'ye çıkarılabilir. Sefuroksim, sefiksim, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim antibiyotiklerinin klavulanat sinerjilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en duyarlı bulunan iki antibiyotik sefepim ve seftazidim olmuştur⁽²¹⁾ (Resim 1).



Resim 1. Ortada amoksisilin-klavulanik asit (AMC), etrafında seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO), sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM), sefuroksim (CXM) ve imipenem (IPM) diskleri konulmuştur. Özellikle CTX diskinin oluşturduğu inhibisyon zonunun AMC diskiye doğru genişlediği görülmektedir.

Kombine (modifiye) disk sinerji testi: CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine disk sinerji yönteminde ise yine MHA besiyerine 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan bakteri süspansiyonundan sürüntü ekimi yapılır. Ekim yapılan plaklara seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) ve sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) diskleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, sefotaksim ve seftazidim diskinin klavulanik asit ile test edildiğinde etrafında gözlenen zon çapının, tek başına test edildiğinde gözlenen zon çapına göre ≥ 5 mm artış göstermesi durumunda GSBL pozitif kabul edilir⁽⁷⁾ (Resim 2).



Resim 2. Sefotaksim ve sefotaksim-klavulanik asit disklerinin zon çapları ölçüldüğünde aralarında 5 mm'den fazla fark olduğu görülmektedir.

E-test yöntemi: Bu yöntemde ticari olarak hazırlanmış şeritler kullanılmaktadır. Şeridin bir tarafında üçüncü kuşak sefalosporinlerden birisi, diğer tarafında üçüncü kuşak sefalosporinle birlikte klavulanik asit emdirilmiş olarak bulunmaktadır. 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan bakteri süspansiyonları MHA besiyerine eküvyonla ekilir. Ekim yapılan plaklara E-test şeritleri yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) değerlendirilir. Klavulanik asitle kombinasyon olan tarafta ölçülen MİK değeri klavulanik asitsiz taraftakinden 8 kat veya daha fazla küçükse GSBL pozitif, aksi ise GSBL negatif olarak kabul edilir. Bazı durumlarda klavulanik asitin diğer tarafa da difüze olması nedeniyle şeridin ortasında bir "fantom zon" görülebilmektedir. Bu zonun görülmesi de GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir⁽¹⁹⁾.

Mikrodilüsyon yöntemi: Üçüncü kuşak sefalosporinlerin MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde $\geq 3 \log_2$ (8 kat) azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir⁽¹⁶⁾.

Üç boyutlu test: Disk difüzyon esaslı bir testtir. Test edilecek mikroorganizma agar yüzeyine yayıldıktan sonra agarda bir yarık açılır. Yarığın içi test edilecek mikroorganizmanın ürettiği sıvı besiyeri (yaklaşık 10^9 - 10^{10} bakteri süspansiyonu) ile doldurulur. Antibiyotik diskleri bu yarıktan 30 mm uzak olacak şekilde dizilir. Sefotaksim, seftazidim, aztreonam, seftriakson diskleri kullanılabilir. Yarığa bakan tarafta, inhibisyon zonunda bozulma ya da daralma pozitif sonuç olarak değerlendirilir⁽¹⁶⁾. Çok duyarlı, ancak emek isteyen, teknik olarak zor bir yöntemdir.

c) Otomatize sistemler

“BD Phoenix” otomatize sistemleri ve Vitek ESBL (GSBL) kard testleri otomatize sistemlere örnek olarak verilebilir. “Phoenix Becton Dickinson” ID sistemleri, GSBL direnç mekanizmasını, CLSI standartlarını temel alarak, buyyon mikrodilüsyon metoduyla tespit etmektedir. “Phoenix” cihazında yoğunluğu ayarlanmış bakteri süspansiyonu besiyeri panellerine bir noktadan verilmekte, besiyerlerine inokülasyon ve inkübasyon cihazda otomatik olarak yapılmaktadır. Panellerdeki sefpodoksim (8 µg/ml), seftazidim (8 µg/ml), seftriakson-klavulanik asit (2-4 µg/ml), seftaksim-klavulanik asit (2-4 µg/ml) ve seftazidim-klavulanik asit (2-4 µg/ml) içeren katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton buyyonu besiyerindeki üremelere ve algoritmaya göre sonuç cihaz çıktısında, GSBL negatif veya GSBL pozitif olarak görülmektedir⁽²⁾. Cihaz, GSBL pozitif suşları, penisilin, sefalosporin (sefamisin grubu hariç) ve aztreonama duyarlı/orta duyarlı olarak tespit ettiğinde; otomatik olarak “dirençli” şeklinde değiştirmektedir. Bu sistem GSBL ürettiği genotipik olarak doğrulanan suşların % 90’ından daha büyük kısmında GSBL üretimini saptayabilmekte ve sonuçlar genellikle altı saat içinde çıkmaktadır⁽¹⁴⁾. Vitek 2’de de çalışma sistemi benzerdir. GSBL belir-

lenmesinde GN13 kartları kullanılmaktadır. Bu kartlarda sefepim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), seftaksim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz), seftazidim (klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz) olmak üzere 6 kuyudaki antibiyotik konsantrasyonları değerlendirilerek sonuç verilmektedir⁽²⁵⁾.

d) Moleküler yöntemler

GSBL saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler DNA problemleri, Polimerase Chain Reaction (PCR), oligotiplendirme, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi, PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analizi, Ligase Chain Reaction (LCR) ve nükleotid analizidir. DNA problemleri gen ailesi için özgül olmasına rağmen, genişlemiş spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz, ayrıca uygulaması çok emek istemektedir. PCR uygulaması da spektrumlu olanları olmayanlardan ayıramaz fakat uygulaması daha kolaydır. Oligotiplendirme özgül TEM türlerini saptayabilmektedir. Spesifik bir restriksiyon enzimi tarafından oluşturulan fragment dizilerindeki varyasyonlara RFLP denir. PCR-RFLP; kolay uygulanır, nükleotidlerdeki özgül değişiklikleri saptayabilir, değişikliklerinin restriksiyon bölgesinde değişime yol açması gerekir. PCR-SSCP; özel elektroforez koşullarını gerektirir ve çeşitli SHV türevlerini ayırt edebilmektedir. LCR’de çeşitli SHV türevlerini ayırt edebilmesinin yanında çok sayıda oligonükleotid primerine gereksinim göstermektedir. Nükleotid dizi analizinde emek yoğun, teknik olarak zordur fakat altın standarttır. Tüm türevleri saptayabilmektedir⁽⁵⁾.

GSBL’nin raporlanması

Yeni standartlarda sınır değerler (breakpoint) aşağı çekilerek, 3. kuşak sefalosporin gibi antibiyotiklere direnç de saptanabildiğinden, rutin olarak GSBL saptanması önerilmemektedir (Tablo 2’de antibiyotiklerin disk difüzyon zon çaplarının 2009, 2010 ve 2011 yıllarında CLSI’da yayınlanmış değerlerini gösterilmektedir). Bu durumda test sonuçları yorum yapmadan bildirilmelidir. Yani suş GSBL yapsa bile, duyarlı olduğu sefalosporin sonucunun dirençli olarak bildirilmemesi önerilmektedir. Önceki

Tablo 2. Disk difüzyon zon çapları (mm) (2009-2010-2011 yıllarında yayınlanan CLSI'lara göre).

Antibiyotikler	M100-S19 (2009)			M100-S20 (2010)			M100-S21 (2011)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Sefazolin	≥ 18	15 - 17	≤ 14	-	-	-	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Sefotaksim	≥ 23	15 - 22	≤ 14	≥ 26	23 - 25	≤ 22	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Seftriakson	≥ 21	14 - 20	≤ 13	≥ 23	20 - 22	≤ 19	≥ 23	20 - 22	≤ 19
Seftazidim	≥ 18	15 - 17	≤ 14	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Aztreonam	≥ 22	16 - 20	≤ 15	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≥ 21	18 - 20	≤ 17

S: Duyarlı I: Orta duyarlı R: Dirençli.

yıllarda GSBL saptandığında yorum yapılarak sefalosporinler, penisilinler ve aztreonam dirençli olarak veriliyordu. 2011 yılında yayınlanan CLSI uygulandığında GSBL saptansa bile beta-laktam antibiyotikler klinik olarak kullanılabilir. Ayrıca CLSI'da rutin uygulamada GSBL saptanmasına gerek olmadığı, GSBL'nin epidemiyolojik olarak incelenmek için ya da enfeksiyon kontrolü amacıyla tanımlanması önerilmiştir⁽⁷⁾. Bu durumun klinikte tedavi başarısızlığına neden olabileceği tartışma konusudur.

II. AmpC beta-laktamazlar

Ambler moleküler sınıflandırmasına göre moleküler sınıf C, Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel gruplandırmasına göre Grup 1'deki beta-laktamazlar AmpC tipi beta-laktamazlar olarak adlandırılır. AmpC beta-laktamazlar türe özgü, kromozomal olarak kodlanan enzimlerdir. Ayrıca plazmidler üzerinde de taşınabilir ve transfer edilebilir. İndüklenebilir veya yapısal özellik gösteren bu enzimler sefalosporinleri penisilinden daha etkin parçalamaktadır⁽⁴⁾.

Kromozomal (indüklenebilir) AmpC beta-laktamaz üreten kökenler beta-laktamazlara dirençlidir (sefepim bu enzime daha dayanıklı bir antibiyotiktir)⁽²⁴⁾. Bu enzimler *Enterobacter*, *Serratia* ve *Morganella* türlerinde geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençten sorumludur ve beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilemez. AmpC üreten mikroorganizmalarda ek olarak dış membran porin kaybı ve/veya eflüks pompasının aşırı ekspresyonu da olursa karbapenem direnci geliştirebilir⁽⁴⁾.

İndüklenebilir beta-laktamaz (İBL) normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenir. Ancak ortamda bir indükleyici beta-laktam antibiyotik bulunduğu zaman daha yüksek miktarda sentezlenmeye başlar. Tüm beta-laktam

antibiyotikler beta-laktamaz üretimini indükleyebilir⁽⁴⁾. İmipenem, klavulanik asit kombinasyonları, sefoksitin ve sefotetan ise güçlü indükleyicilerdir; ikinci kuşak, üçüncü kuşak sefalosporinler, aztreonam, üreidopenisilinler ve karboksipenisilinler ise zayıf indükleyicilerdir. Karbapenemler hem indükleyici hem de dereprese mutantlara etkili olduğu için seleksiyona yol açmaz. İBL sentezleyen bakterilerde 10^{-5} - 10^{-7} sıklığında devamlı yüksek düzeyde enzim sentezleyen dereprese mutantlar oluşmaktadır. Dereprese mutantlar İBL sentezleyen bakteri topluluklarında zayıf indükleyiciler ile tedavi sırasında ortaya çıkabilirler. Böyle bakterilerle oluşan enfeksiyonların bir indükleyici antibiyotik ile tedavisi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması ve antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalması ile tedavi başarısızlıkları olabilmektedir^(18,24). İBL yapısal genleri (*ampC*), aktivatör represör genler (*ampR*) ve baskılayıcı (*ampD*) genlerin etkisi altındadır. Kromozomal AmpC tipi indüklenebilir beta-laktamaz üreten bakteriler *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *M.morganii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *P.aeruginosa*'dır⁽³⁾.

Plazmid kaynaklı AmpC üreten bakteriler kromozomal AmpC tipi beta-laktamazların plazmidlere transferi ile gelişmiştir. Kromozomal AmpC ile aynı biyokimyasal özellikleri taşırlar ve aynı antibiyotiklere etki ederler. Plazmid kaynaklı AmpC üretiminden *ampR* regülatör geninin kaybı nedeniyle yüksek seviyelerde enzim üretimi sorumlu tutulmuştur. Bu enzimler çoğunlukla *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Salmonella* spp., *P.mirabilis* ve *E.coli*'de bildirilmiştir. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamları hidroliz ederler. Kromozomal olanlara göre epidemiyolojik olarak tehlike potansiyeli daha fazladır ve indüklenme özellikleri yoktur⁽¹¹⁾.

2011'de yayınlanan CLSI'da AmpC beta-

laktamazın tespiti için pratik ve uygulanabilir bir yöntem önerilmemiştir⁽⁷⁾.

İndüklenebilir beta-laktamazların laboratuvar tanısı

Disk difüzyon yöntemi: MHA besiyerine, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan yayma ekimi yapılır. Antibiyogramda sefoksitin ve imipenem gibi güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisinin yanına merkezden 1.5-2 cm uzaklıkta aztreonam veya üçüncü kuşak sefalosporin (özellikle sefuroksim, sefotaksim gibi zayıf indükleyici) diski yerleştirilir. 35°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonunda zayıf indükleyici tarafındaki yarıçapının, karşı taraf yarıçapına göre en az 4 mm ve daha fazla küçülmesi indüklenebilir beta-laktamaz açısından pozitif olarak değerlendirilir⁽⁴⁾. Rutin olarak İBL test edilmesi önerilmemektedir. Bu türlerle oluşan infeksiyonlarda penisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam kullanımı sırasında bu antiyotiklere karşı direnç gelişebileceği bilinmelidir. Uzun süren tedavilerde antibiyogram üç-dört günde bir tekrarlanmalıdır.

Yüksek düzey AmpC sentezi GSBL'nin tanınmasını engeller. Test edilen plazmidik AmpC üreten bir suş ise, GSBL taraması pozitif (disk difüzyon tarama testi) fakat doğrulama testleri negatifse, sefoksitin diskine bakılır. Eğer sefoksitine dirençli ya da orta duyarlı ise plazmidik AmpC ile beraber GSBL'den şüphelenilir.

Plazmid kaynaklı AmpC'nin laboratuvar tanısı için AmpC'den etkilenmeyen substratlar seçilir, örneğin sefepim ÇDST veya sefepim ve sefepim-klavulanik asit E-testleri kullanılabilir. AmpC inhibitörlerinin kullanılması (kloksasilin, boronik asit ve türevleri) ile de tanımak mümkündür. Tanı için kullanılacak diğer yöntemler de modifiye Hodge testi (MHT), sefoksitin agar besiyeri ve moleküler yöntemlerdir^(4,32).

Plazmid kaynaklı AmpC'nin laboratuvar tanısı

Üç boyutlu (3D) test yöntemi: MHA besiyerine ATCC 25922 *E.coli* suşu yayılarak ortasına sefoksitin diski konur. Diskin 5 mm dışından steril bir bistüri ile petrinin dış kenarına kadar besiyeri kesilir. Bu boşluğa AmpC beta-laktamaz enzimi aranan suşun enzim ekstraksiyonu konu-

arak sefoksitin zon çapındaki daralma değerlendirilir. Düşük düzeyde enzim sentezleyen suşlarda inhibisyon zonunun görülmemesi bu testin dezavantajıdır⁽⁴⁾.

Kloksasilin inhibisyon testi: AmpC tipi sefalosporinaz inhibisyonunu yapan kloksasilin 250 µg/ml olacak şekilde MHA besiyerine eklenir. Suşlar buyyon besiyerinde 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon edilir. Bu süspansiyon kloksasilinli ve kloksasilinsiz MHA besiyeri yüzeyine yayılır. Kuruyana kadar bekledikten sonra ortasına üçüncü kuşak sefalosporin diski konulur. 35°C'de bir gece inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirilir. Aynı suşun kloksasilinsiz besiyerindeki üçüncü kuşak sefalosporin diskinin zon çapı, kloksasilinli besiyerindeki orana 10 mm veya daha fazla artış göstermişse sonuç pozitif kabul edilir⁽⁹⁾.

Modifiye Hodge testi (MHT): İndikatör organizma olan ATCC 25922 *E.coli* suşu MH buyyon besiyerinde yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde süspansiyon edilir. Bu süspansiyon MHA besiyeri yüzeyine yayılır. Besiyeri üzerindeki nem tamamen kuruduktan sonra 30 µg'lık sefoksitin diski besiyerinin ortasına yerleştirilir. Steril bistüri ile diskin 5 mm dış kısmından başlayarak besiyerinin dış kısmına kadar kesi yapılır. Suşun daha önce ekstrakte edilmiş enziminin 25 µl alınıp mikropipetle oluşturulan yarığın içine konulduktan sonra 35°C'de bir gece inkübe edilir. Sefoksitin duyarlılık zon çapında 3-10 mm daralma görünen suşlar pozitif kabul edilir⁽⁴⁾.

Sefoksitin agar besiyeri (CAM): 3D yöntemine benzer fakat disk yerine denenecek bakterinin duyarlı olduğu konsantrasyon sınırları içinde çift kat seri sulandırım ile hazırlanmış sefoksitin süspansiyonu (2, 4, 6, 8, 16 µg/ml) MHA besiyerine katılır. Daha sonra, besiyerinde açılan kuyucuğa bakterinin enzim ekstraksiyonu konur. Kuyucuğun çevresinde normalde ürememesi gereken sefoksitine duyarlı kontrol suşunun (ATCC 25922 *E.coli*) üremesi esasına dayanarak yapılır⁽⁴⁾. Tek bir plakta birkaç suş test edilebilmektedir ve 4 µg/ml sefoksitin içeren CAM yönteminin üç boyutlu test yöntemine

göre duyarlılık ve özgülük yönünden eşdeğer olduğu belirtilmektedir⁽²⁶⁾.

AmpC beta-laktamazların raporlanması

Yalnız kromozomal AmpC'si olan suşlar için rapora; 'İndüklenebilen beta-laktamızı vardır, tedavi sırasında beta-laktam direnci gelişebilir' yazısı eklenebilir. 2011'de yayınlanan CLSI'da AmpC beta-laktamızı tespit edenler için raporlanması ile ilgili bilgi verilmiştir⁽⁷⁾.

III. Karbapenemazlar

Karbapenemler; antibakteriyel spektrumlarının genişliği, AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olmaları nedeniyle özellikle çok ilaca dirençli Gram negatif bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur. Son yıllarda artan GSBL ve AmpC oranları ve bunun sonucunda artan karbapenem kullanımına paralel olarak, karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazların sayısı da artmaktadır⁽³²⁾.

Karbapenemazlar, en geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta-laktam sınıfı olan karbapenemlerden en az birini belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Karbapenemazlar Ambler sınıflamasında üç grupta yer alırlar. Moleküler sınıf A'daki karbapenemazların aktif bölgesinde serin iyonu vardır ve klavulanik asit ile inhibe olur. Moleküler sınıf B'de enzimin aktif bölgesi çinko iyonu içerir; MBL olarak sınıflandırılan bu grup klasik beta-laktam inhibitörlerine dirençlidir. Metal şelatörlere ya da thiol komponentlerine duyarlıdır. Moleküler sınıf D karbapenemazlar da enzimin aktif bölgesinde serin içerirler, fakat beta-laktamaz inhibitörlerine az duyarlıdır. MBL'ler EDTA ve 2-merkaptopropionik asit (MPA) ile inaktive olur. Monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları ve karbapenemleri inaktive ederler^(1,31).

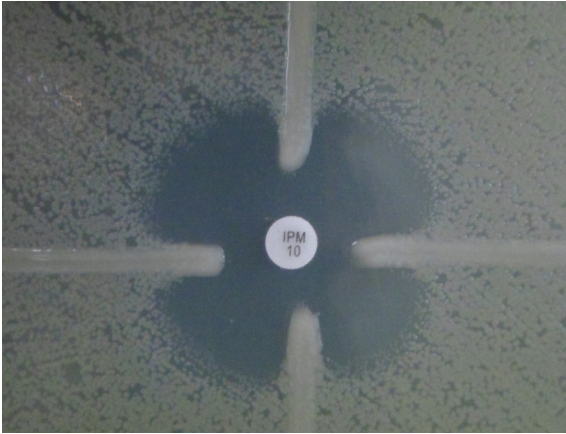
İlk olarak 1991'de Japonya'da MBL (IMP-1) üreten *P.aeruginosa*'nın bildirilmesinden sonra Japonya başta olmak üzere çeşitli Asya ve Avrupa ülkelerinden Gram negatif çomaklarda, özellikle *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarında, yeni MBL'ler (IMP, VIM, GIM, SPM, NDM-1) bildirilmiştir ve son yıllarda sayıları artarak

dünya çapında yayılma göstermektedir^(13,28,31). Bunların düzenli aralıklarla izlenmesi gerekmektedir^(28,30).

Karbapenemlerden herhangi birisine azalmış duyarlılık (orta duyarlı/dirençli) varlığında ya da bir suş bir veya birden fazla üçüncü kuşak sefalosporine (sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi) dirençli ise karbapenemaz varlığı araştırılmalıdır. Ertapenem (10 µg) veya meropenem (10 µg) diskleriyle alınan zon çapları ≤ 22 mm ise karbapenemaz varlığından şüphe edilir. Şüpheli suşa MHT yapılır. 2011 yılında yayınlanan CLSI'da suşların karbapenemaz açısından rutin olarak test edilmesi önerilmemektedir. İnfeksiyon kontrol amacıyla ya da epidemiyolojik açıdan karbapenemaz saptamak için MHT uygulanabilir⁽⁷⁾. MBL aktivitesinin EDTA ve MPA gibi metal şelatörler ile inhibe olma özelliklerinden yararlanılarak bu enzimleri erken tanıyabilecek tarama amaçlı basit fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar imipenemli veya seftazidimli EDTA veya MPA disklerini kullanan çift-disk sinerji testi, seftazidim veya imipenemli EDTA kombine disk testi, MBL E-test ve imipenemli EDTA kullanan mikrodilüzyon testidir. Yeni kromojenik besiyerleri "Chromagar KPC" ile karbapenemli disk içeren MacConkey agar ile karşılaştırıldığında, karbapenem direnci daha hızlı saptanır⁽²⁷⁾. Polimeraz zincir reaksiyonu eklenince duyarlılık ve özgülük (> % 92) her iki testle artar⁽³²⁾.

Karbapenemazların laboratuvar tanısı

Modifiye Hodge testi: İmipenem duyarlı *E.coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5'in 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak MHA plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekilir. Plağın merkezine ertapenem (10 µg) ya da meropenem (10 µg) diski yerleştirilir. Test edilecek suşlar, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekilir. 35°C'de 16-18 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda çarpıklık görülmesi veya yonca görünümü pozitif olarak kabul edilir^(7,29) (Resim 3).



Resim 3. MHT uygulanmış suşlarda pozitiflik ve yonca görünümü izlenmektedir.

Çift disk sinerji testleri (ÇDST): MBL saptanması çalışmalarında ve seftazidim disklerinin EDTA, MPA, merkapto asetik asit emdirilmiş disklerle yapılan çift disk sinerji testleri kullanılabilir⁽³⁰⁾. Lee ve ark.⁽²³⁾ imipenem dirençli suşlarda MBL saptanması için imipenem-EDTA ÇDST'yi uygulamışlardır. Bu test için test edilecek imipenem dirençli *P.aeruginosa* suşunun bir gecelik inkübasyonu sonrası elde edilen kültür süspansiyonu MHA plağının üzerine 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ekilir. Plak yüzeyi kurduktan sonra 10 µg imipenem diski yerleştirilir. İmipenem diskinin 15 - 20 mm ötesine 0.5 molarlık EDTA solüsyonunun 10 µl'si emdirilmiş disk yerleştirilir. Bir gecelik inkübasyondan sonra inhibisyon zonunda düzensizleşmelerin olması MBL pozitifliği olarak değerlendirilir^(22,23).

Kombine disk diffüzyon testi: Test edilecek bakteri MHA'da inoküle edilir ve iki imipe-

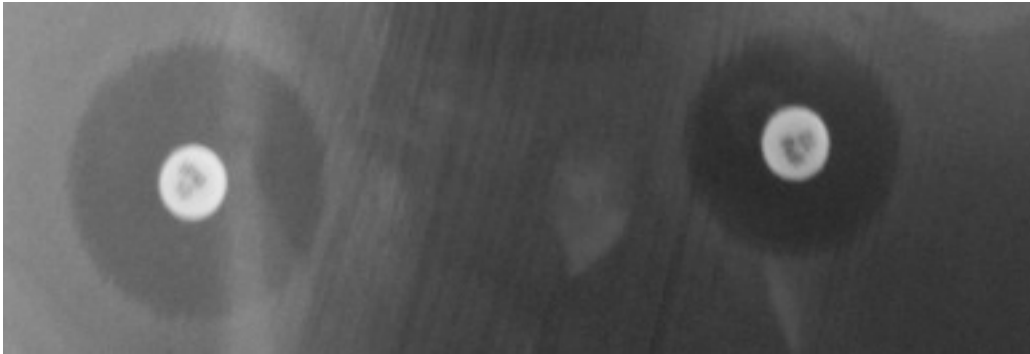
nem (10 µg) diski yerleştirilir. Disklerden birisinin üzerine 0.5 M EDTA'nın pH 8'de hazırlanmış solüsyondan 4 µl eklenir ve bir gecelik inkübasyondan sonra imipenem diski ile imipenem-EDTA'lı diskin zon çaplarında 7 mm veya daha fazla fark olması MBL pozitifliği olarak yorumlanır. Kombine disk difüzyon testinde imipenem-EDTA kombinasyonu dışında MPA ile kombinasyon da kullanılabilir⁽³³⁾ (Resim 4).

E-test yöntemi: İmipenem ya da seftazidime, EDTA ya da MPA eklenerek E-test şeritleri geliştirilmiştir. MHA besiyerine test edilecek bakteri ekimi yapılır. Plaklar kurduktan sonra E-test şeritleri yerleştirilir. 35°C'de ve 16-18 saat inkübasyondan sonra imipenem/imipenem-EDTA MİK oranlarının 8 kat azalması ya da fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilir. Bu yöntem % 94 duyarlı ve % 95 özgün bulunmuştur⁽³³⁾.

Yan ve ark.⁽³³⁾ *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında MBL üretiminin belirlenmesi için kullanılan üç farklı yöntemin (çift disk sinerji yöntemi, kombine disk yöntemi, E-test MBL yöntemi) duyarlılıklarını ve özgüllüklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* için duyarlılık ve özgüllük oranlarını, çift disk sinerji yönteminde % 95.7 ve % 95, kombine disk yönteminde % 87 ve % 96.7 ve E-test MBL yönteminde % 87 ve % 100 olarak belirlemişlerdir.

Karbapenemazların raporlanması

İnfeksiyon kontrolü açısından ya da epidemiyolojik bilgi vermek amacıyla MHT testi sonuçları raporlanır. Ayrıca MHT pozitif çıkan



Resim 4. Kombine disk difüzyon testi: Sol tarafta imipenem EDTA'lı disk, sağ tarafta imipenem diski görülmektedir. Zon çapları ölçüldüğünde aralarında 7 mm fark görülmektedir ve MBL pozitif olarak yorumlanırlar.

suşun karbapenem MİK değerleri belirlenir ve rapora MİK değerleri eklenir. Suşların karbapenem duyarlılıkları olduğu gibi raporlanır, değiştirilmez⁽⁷⁾.

KAYNAKLAR

1. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle karşılaştırılması, *Klimik Derg* 2004; 17(1):47-9.
2. Akyar I, Kocagöz S, Kocagöz T ve ark. Beş yılda izole edilen 15434 Escherichia coli ve 3178 Klebsiella spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı, *ANKEM Derg* 2010; 24(1):34-41.
3. Albayrak GT. Hastane infeksiyonu etkeni olan Pseudomonas aeruginosa kökenlerinde çift disk sinerji testi ve kombine çift disk sinerji ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması, Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul (2008).
4. Balıkcı A. Escherichia coli ve Klebsiella cinsi bakterilerde plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz direnci, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul (2007).
5. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamase in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):933-51. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001> PMID:11585791 PMCID:89009
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-33. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211> PMID:7574506 PMCID:162717
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document M100-S20, CLSI, Wayne PA (2011).
8. Çelebi S, Yüce N, Çakır D, Hacımustafaoğlu M, Özkaya G. Çocuklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten E.coli infeksiyonlarında risk faktörleri ve klinik sonuçları; beş yıllık çalışma, *Çocuk Enf Derg* 2009;3(1):5-10.
9. Decre D, Burghoffer B, Gautier V, Petit JC, Arlet G. Outbreak of multi-resistant Klebsiella oxytoca involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase, *J Antimicrob Chemother* 2004;54(5):881-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh440> PMID:15472005
10. Dizbay M, Karakuş R, Arman D. Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanması (Özet), *ANKEM Derg* 2000;14(2):136.
11. Dumlupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler, *Klimik Derg* 2001;(2):47-56.
12. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms, *J Hosp Infect* 2009;73(4):345-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021> PMID:19596491
13. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: A summary report from the Worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 4):S276-8. <http://dx.doi.org/10.1086/430790> PMID:16032565
14. Güdücüoğlu H, Baykal S, İzci H, Berktaş M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarının antibiyotiklere direnci, *ANKEM Derg* 2007;21(3):155-60.
15. Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu, *Türk Toraks Derg* 2002;3(1):75-88.
16. Gülay Z. ESBP'lerin tanı yöntemleri, 'Köksal İ (ed): Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar' kitabından s.13-26, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2004).
17. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, 'Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 1' kitabında s.243-57, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (2008).
18. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları, *Hastane İnfeksiyon Derg* 1997; (1): 38-45.
19. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy, *Korean J Lab Med* 2008;28(6):401-12. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.6.401>

- PMid:19127103
20. Jacoby G, Bush K. Beta-lactam resistance in 21st century, "White DG, Alekshun MN, Mc Dermott PF (eds). *Frontiers in Antimicrobial Resistance*" kitabında s:53-65, ASM Press, Washington (2005).
 21. Kaçmaz B, Ece G. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin çift disk sinerji testinde kullanılması ve sefoksitin duyarlılığı, *ANKEM Derg* 2010;24(2):61-4.
 22. Lee K, Chong Y, Shin HB et al. Modified Hodge test and EDTA synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species, *Clin Microbiol Infect* 2001;7(7):88-91.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x>
PMid:11298149
 23. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4623-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>
PMid:14532193 PMCID:254300
 24. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
PMid:8665470 PMCID:172876
 25. Mehli M, Zer Y, Gayyurhan E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Enterobacteriaceae suşlarında GSBL oluşturmanın ÇDST ve VITEK 2 yöntemleri ile araştırılması, *ANKEM Derg* 2007;21(2):71-5.
 26. Nasim K, Elsayed S, Pitout JDD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpCs-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 2004;42(4):4799-802.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.10.4799-4802.2004>
PMid:15472344 PMCID:522373
 27. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, *Lancet Infect Dis* 2009;9(4):228-36.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
 28. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers, *J Clin Microbiol* 2011;49(2):718-21.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01773-10>
PMid:21123531 PMCID:3043507
 29. Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices, *Drugs* 2010;70(3):313-33.
<http://dx.doi.org/10.2165/11533040-000000000-00000>
PMid:20166768
 30. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum-beta-lactamases (ESBLs) in the community, *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1):52-9.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki166>
PMid:15917288
 31. Sarı H. Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/ meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye Hodge test ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması, Uzmanlık Tezi, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul (2005).
 32. Taşova Y. Gram negatif enterik bakteri enfeksiyonlarının yönetimi, *ANKEM Derg* 2011;25(2):33-44.
 33. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E- test methods for detecting metallo-β-lactamases in Gram negative bacilli, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(1):5-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.01.002>
PMid:15135493