

HASTANE KAYNAKLI İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE *KLEBSIELLA OXYTOCA* TÜRLERİNDE GENİŞLETİLMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ SAPTANMASI

Birgül KAÇMAZ*, Fazilet Özenç ÇAKIR**, Altan AKSOY***

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

*** Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE

ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden hastane infeksiyon etkeni olarak izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığı araştırılmıştır. GSBL üretimini saptamak için çift disk sinerji (ÇDS), disk difüzyon tarama ve fenotipik doğrulama testleri kullanılmıştır. Fenotipik doğrulama testine göre diğer iki testin duyarlılık, özgüllük ve teşhis doğrulukları değerlendirilmiştir.

İncelenen bakterilerde % 66 oranında GSBL üretimi saptanmıştır. *E.coli* ve *K.oxytoca*'ya göre *K.pneumoniae* izolatlarında daha yüksek oranda GSBL üretimi bulunmuştur. ÇDS testinin duyarlılık, özgüllük ve teşhis doğrulukları sırasıyla % 82, % 85 ve % 83 oranında tespit edilmiştir. 1997'de yayınlanan NCCLS disk difüzyon değerlendirme kriterlerinin 1997'den önce yayınlanan kriterlere göre GSBL üretimini göstermede daha duyarlı olduğu saptanmıştır. En duyarlı indikatör antibiyotik seftazidim olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte disk difüzyon tarama testinde en az iki geniş spektrumlu beta-laktam kullanılmasıyla yanlış negatiflik oranlarının azalacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: çift disk sinerji, Enterobacteriaceae, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz, tarama ve doğrulama testleri

SUMMARY

Detection of Extended Spectrum Beta-lactamase Production in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* Strains Isolated from Nosocomial Infections

The presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in the nosocomial isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* was investigated. To detect ESBL production, double-disk synergy (DDS), disk diffusion screening and phenotypical confirmation tests were used. The sensitivity, specificity and diagnostic reliability of the other two tests were evaluated according to phenotypical confirmation test results.

There was 66 % ESBL production in the bacteria studied. In *K.pneumoniae* isolates, there was a higher rate of ESBL production than in *E. coli* and *K. oxytoca* isolates. The sensitivity, specificity and diagnostic reliability of DDS test were 82 %, 85 % and 83 %, respectively. NCCLS disk diffusion criteria published in 1997 were found to be more sensitive in revealing ESBL production than those published before 1997. Ceftazidime was shown to be the most sensitive indicator antibiotic. In addition, it was concluded that by the use of at least two wide-spectrum beta-lactams in disk diffusion screening test, the rate of false negativity could be decreased.

Keywords: double-disk synergy test, Enterobacteriaceae, extended spectrum beta-lactamase, screening and confirmation methods

Yazışma adresi: Birgül Kaçmaz, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

Tel: (0312) 202 40 83

e-posta:kacmazbirgul@mynet.com

Alındığı tarih: 07.03.2005, revizyon kabulü: 27.07.2005

GİRİŞ

Hastane infeksiyon etkeni olan mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci önemli bir sorundur. Bu durum hastaların ekonomik olarak tedavi yükünü arttırırken aynı zamanda mortalite ve morbidite oranlarının da artmasına neden olur⁽²⁾.

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) plazmidlerle taşınan oksiminosefalosporinlere ve aztreonam gibi monobaktamlara direnç gelişimine yol açan enzimlerdir. GSBL'ler en sık *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli*'de görülmesine rağmen *Enterobacteriaceae* familyasının diğer üyelerinde ve *Pseudomonas aeruginosa*'da da saptanmıştır⁽¹⁷⁾.

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakteriler rutin duyarlılık deneylerinde sefotaksim (CTX), seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ) ve/veya aztreonam (AZT) direnç görülmesi ile belirlenebilir. Ancak bazen GSBL oluşturan kökenlerle yapılan duyarlılık deneylerinde bu bakterilere direnç saptanamaz ve bu durum da klinikte tedavi başarısızlıklarına yol açar⁽¹⁸⁾. Bu nedenle GSBL üreten klinik izolatların laboratuvarında güvenilir bir şekilde tespit edilebilmesi için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları çift disk sinerji (ÇDS) testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri, otomatize sistemler (Vitek) ve E-test'dir⁽³⁾. 1996 yılında yayınlanan çalışmalarda GSBL üreten suşların geniş spektrumlu sefalosporinlere direncini belirlemede National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerinin yetersiz kaldığı bildirilmiştir^(8,11). 1997 yılında da NCCLS *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *E.coli*'de GSBL'yi tespit etmek için tarama ve fenotipik doğrulama testlerini yayınlamıştır. Buna göre tarama testinde geniş spektrumlu beta-laktam ajanların (sefpodoksim, CAZ, AZT, CTX ve CRO) minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) >2 mg/l olmasının veya inhibisyon zon çaplarının sefpodoksim için ≤22 mm, AZT için ≤27 mm, CAZ için ≤22mm, CTX için ≤27 mm ve CRO için ≤25 mm olmasının bakteride GSBL üretimi şüphesini düşündürmelidir. Tarama testinde GSBL üretimi şüphesi olan bakterilere fenotipik doğrulama testi uygulanmalıdır. Fenotipik doğrulama testinde hem CTX hem de CAZ tek başına ve klavulanik asit (KA) ile birlikte test edilmelidir. İlacın zon çapının KA ile test edildiğinde tek başına test edildiğine göre ≥5 mm artması GSBL pozitifliğini göstermektedir⁽¹³⁾.

Bu çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Kontrol Komitesince hastane infeksiyonu tanısı konulan hastaların değişik klinik örneklerinden izole edilen *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli* suşları alınmıştır. Bu suşlarda GSBL varlığı ÇDS testi ve disk difüzyon tarama testi ile araştırılmış, bu sonuçların fenotipik doğrulama testine göre duyarlılık, özgüllük ve teşhis doğrulukları değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada toplam 100 *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *E.coli* suşu kullanılmıştır. Bu suşlar 2003 yılı içerisinde çeşitli nedenlerle hastanemizde yatarak tedavi gören ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kriterlerine göre hastane infeksiyonu tanısı konulan rastgele seçilmiş 100 hastanın değişik örneklerinden izole edilmiştir. Bakteriler klasik biyokimyasal testler ve BD BBL Crystal Gram Negative ID System/GN (Becton, Dickinson and Company, USA) ile tanımlanmıştır. Her hastanın tek bir izolatu çalışmada kullanılmıştır. Suşlarda GSBL varlığını saptamak amacıyla ÇDS, disk difüzyon tarama ve fenotipik doğrulama testi uygulanmıştır. Kontrol suşu olarak *E.coli* 25922 kullanılmıştır.

Çift disk sinerji testi: Burada McFarland 0.5'e göre ayarlanan bakteri süspansiyonu, Mueller Hinton agar ekilip ardından amoksisilin (20 µg) / KA (10 µg) diskinin çevresine CAZ (30 µg), CTX (30 µg), CRO (30 µg) ve AZT (30 µg) (Oxoid) diskleri merkezden merkeze uzaklık 25 mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda amoksisilin/KA diskinin etrafındaki disklerden birinin inhibisyon zonunda KA içeren diske doğru genişlemesi GSBL yapımı lehine yorumlanmıştır⁽⁹⁾.

Disk difüzyon tarama testi: GSBL saptanmasında gösterge olan antibiyotiklerden CAZ, AZT, CRO ve CTX duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde 1997 öncesi⁽¹²⁾ ve 1997'de⁽¹³⁾ yayınlanan NCCLS kriterleri kullanılmıştır.

Disk difüzyon fenotipik doğrulama testi: Bakteriler CTX ve CTX+KA, CAZ ve CAZ+KA ile standart disk difüzyon önerileri doğrultusunda test edilmiştir. İlacın zon çapının KA ile test edildiğinde tek başına test edildiğine göre ≥5 mm artması GSBL varlığı için pozitif kabul edilmiştir⁽¹³⁾.

Sonuçlar duyarlılık = doğru pozitiflik/doğru pozitiflik+yanlış negatiflik, özgüllük = doğru negatiflik/doğru negatiflik+yanlış pozitiflik ve teşhis doğruluğu = doğru pozitiflik+doğru negatiflik/çalışılan bakteri sayısı formülleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya toplam 100 hastadan izole edilen 100 farklı bakteri alınmıştır. Hastaların 46'sı erkek, 54'ü kadın idi. Çalışmada izole edilen bakterilerin klinik örneklere ve türlere göre dağılımı tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1: Bakterilerin türlere ve klinik örneklere göre dağılımı.

Bakteri	İdrar	Kan	DVS*	Yara	Toplam
<i>E.coli</i>	40	7	2	15	64
<i>K.pneumoniae</i>	13	3	5	1	22
<i>K.oxytoca</i>	4	-	2	8	14
Toplam	57	10	9	24	100

*= diğer vücut sıvıları (plevra, periton, beyin omurilik sıvısı)

Fenotipik doğrulama testine göre 100 bakterinin 66'sında GSBL üretimi saptanmıştır. Bu bakterilerin 40'ı (% 61) *E.coli*, 17'si (% 26) *K.pneumoniae* ve 9'u (% 13) *K.oxytoca* suşlarıdır. GSBL üretiminin bakteri türlerine göre dağılımı tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2: GSBL üretiminin bakteri türlerine göre dağılımı.

Bakteri (n)	GSBL(pozitif)*	GSBL(negatif)*
<i>E.coli</i> (64)	40 (63)	24 (37)
<i>K.pneumoniae</i> (22)	17 (77)	5 (23)
<i>K.oxytoca</i> (14)	9 (64)	5 (36)
Toplam (100)	66 (66)	34 (34)

* n (%)

Fenotipik doğrulama testine göre GSBL üretimi saptanan 66 suşun 1997 öncesi ve 1997 yılı NCCLS disk difüzyon testi kriterleri ile değerlendirildiğinde saptanan duyarlılık, özgüllük ve teşhis doğruluğu yüzde oranları tablo 3'de sunulmuştur.

1997 yılı öncesi disk difüzyon değerlendirme kriterleri esas alındığında test edilen antibiyotik disklerinin hiçbirinde yanlış pozitiflik saptanmamıştır. Böylelikle hepsinin özgüllükleri % 100, duyarlılıkları ise % 76-63 arasında değişen oranlarda bulunmuştur. 1997 yılında yayınlanan GSBL disk difüzyon tarama testi değerlendirme kriterleri dikkate alındığında duyarlılık oranlarının arttığı saptanmıştır. Özellikle CAZ'daki duyarlılık artışı diğer antibiyotiklere göre daha belirgin olmuştur. Antibiyotiklerin teşhis doğruluğu her iki yıla ait kriterlerle hesaplandığında en yüksek oranın CAZ'da olduğu görülmüştür.

Çift disk sinerji testinin duyarlılığı % 82, özgüllüğü % 85, teşhis doğruluğu ise % 83 olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinde penisilin ve sefalosporinlere karşı en önemli direnç mekanizmalarından biridir. Bu enzimleri kodlayan genler sıklıkla birden fazla antibiyotige dirençten sorumlu plazmidlerle taşınır ve *Enterobacteriaceae* ailesinin değişik türleri arasında kolaylıkla transfer edilir. GSBL üreten patojenlerle oluşan infeksiyonlar penisilin ve sefalosporinlerle tedavi edilemez. Bu nedenle hastanelerde bu tip mikroor-

ganizmaların tanımlanması, uygun şekilde tedavi edilmesi ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir⁽¹⁶⁾.

GSBL oluşturan *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinin in-vitro koşullarda tanınabilmesi için NCCLS beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü sinerjisinin gösterilmesi esasına dayanan tarama ve fenotipik doğrulama testini yayınlamıştır⁽¹³⁾. GSBL ürettiği saptanan mikroorganizmalar penisilinlere, sefamisinler hariç tüm sefalosporinlere ve aztreonama dirençli olarak rapor edilmelidir⁽¹⁶⁾.

Bu çalışmada *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* türlerinde GSBL oluşumu disk difüzyon yöntemi ile NCCLS önerileri doğrultusunda fenotipik doğrulama testi uygulanarak saptanmıştır. Hastane infeksiyon etkeni olarak çeşitli klinik materyallerden izole edilen 100 suşun 66'sında GSBL üretimi fenotipik olarak doğrulanmıştır. GSBL üreten mikroorganizmaların, çoğunlukla hastane infeksiyon etkeni olan izolatlar olduğunu dikkate alırsak bu oranın yüksekliği açıklayabiliriz⁽⁵⁾. Çalışılan izolatlar arasında GSBL oranının *K. pneumoniae*'de diğer iki türe göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ülkemizde de GSBL oranını *K. pneumoniae*'de diğer iki türe göre daha yüksek olduğunu saptayan çalışmalar vardır^(4,6). GSBL'ların en sık saptandığı suşların *K.pneumoniae* izolatları olmasının nedeni spontan mutasyonların daha sık olmasına bağlanabilir⁽¹⁹⁾.

Bu çalışmada aynı zamanda fenotipik doğrulama testi ile ÇDS testi ve disk difüzyon tarama testi değerlendirme kriterleri ile karşılaştırılmıştır. ÇDS testi GSBL tayininde halen en yaygın, en ucuz ve en kolay yöntem olduğu için ülkemizde pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmaktadır^(1,10). Bu çalışmada ÇDS testinin fenotipik doğrulama testine göre duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 82 ve % 85 olarak bulunmuştur. ÇDS testinin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Örneğin bazı suşlar tarafından yüksek düzeyde oluşturulan sefalosporinazlar sinerjik etkinin görülmesini önleyebilmektedir. Diskler arasındaki uzaklığın da deneyin sonucunu etkilediği, bazen GSBL oluşturan suşlarla yapılan ve diskler arasındaki uzaklığın 30 mm olarak ayarlandığı deneylerde yanlış negatif sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Özellikle indüklebilir kromozomal AmpC beta-laktamazını yüksek düzeyde sentezleyen *Enterobacteriaceae* suşlarında, inhibisyon zonu oluşmaması veya küçük inhibisyon zonu oluşması nedeniyle sinerji testi negatif sonuç verebilmektedir. Böyle durumlarda diskler arası

Tablo 3: GSBL varlığı saptanan suşların 1997 öncesi ve 1997 yılı NCCLS disk difüzyon testi kriterleri ile değerlendirilmesi (%).

Kriter	CAZ			AZT			CTX			CRO		
	duyar	özgül	td.	duyar	özgül	td.	duyar	özgül	td.	duyar	özgül	td.
1997 öncesi	76	100	85	71	100	81	68	100	79	63	100	76
1997	92	95	93	2	85	83	76	80	78	79	100	86

duyar=duyarlılık, özgül= özgüllük, td.=teşhis doğruluğu

mesafenin 20 mm tutulması veya kromozomal beta-laktamazlardan çok az etkilenen sefepim veya sefpirom disklerinin kullanılması ile deneyin tekrarlanması önerilmektedir. Ayrıca klavulanat diskinde meydana gelebilecek potans kaybının da dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir. Son zamanlarda TEM ve SHV dışı bazı GSBL'ların klavulanata dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu tür GSBL taşıyan bakteriler bu yöntemle saptanamamaktadır⁽¹⁵⁾.

ÇDS testinde 66 bakterinin 54'ünde GSBL saptanmıştır. Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı bu oranın saptanandan biraz daha yüksek olması beklenebilir.

Bu çalışmada da 1997 yılı öncesi disk difüzyon değerlendirme sınırları dikkate alındığında antibiyotiklerin duyarlılıklarının % 63-76, teşhis doğruluklarının ise % 76-85 arasında değiştiği görülmüştür. Buna karşılık 1997 yılında yayınlanan disk difüzyon tarama testi sınırlarına göre ise antibiyotiklerin hem duyarlılık oranlarının, hem de teşhis doğruluğu oranlarının yükseldiği saptanmıştır. En iyi indikatör antibiyotiğin ise CAZ olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer olarak Ho ve ark.⁽⁷⁾, Winokur ve ark.⁽²⁰⁾ da yaptıkları çalışmada disk difüzyon tarama testinde en iyi endikatör antibiyotik diskinin CAZ olduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşılık Navon-Venezia ve ark.⁽¹⁴⁾ ise CTX'in diğer test ettikleri geniş spektrumlu sefalosporinlerden (CAZ, CRO) ve aztreonamdan daha üstün olduğunu bulmuşlardır. Bu farklı sonuçları değişik coğrafi bölgelerde baskın olan enzimlerin değişkenliğiyle açıklayabiliriz. GSBL substrat profillerindeki farklılıklardan dolayı üçüncü kuşak sefalosporinlerden hiçbirinin tek başına bütün GSBL üreten suşları saptamayacağı bilinmelidir. Bu nedenle yanlış negatiflikleri önlemek için disk difüzyon tarama testinde en az iki sefalosporinin değerlendirilmesinin uygun olacağını düşünüyoruz.

Sonuç olarak bu çalışmada hastane infeksiyon etkeni olan *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarında GSBL üretimi % 66 gibi yüksek oranda bulunmuştur. Özellikle *K.pneumoniae* izolatlarında GSBL diğer iki türe göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Klinik izolatların GSBL yönünden klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak taranması gerekmektedir. Bu mikroorganizmaların tespit edilmesi, erken dönemde infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasını ve hastaların uygun şekilde tedavi edilmesini sağlar. GSBL tespitinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarı en güvenilir yöntemi tercih etmelidir. Bu çalışmada 1997 yılında yayınlanan disk difüzyon tarama testi kriterlerinin ÇDS testine ve 1997 yılı öncesi yayınlanan disk difüzyon değerlendirme kriterlerine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Özellikle GSBL tespitinde kullanılan dört geniş spektrumlu sefalosporinden CAZ'ın en iyi indikatör olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen disk difüzyon tarama testinin güvenilirliğini arttırmak için en az iki geniş spektrumlu sefalosporin kullanılmasının daha uygun olacağı saptanmıştır. Klavulanata dirençli GSBL'ların

bu yöntemlerle gözden kaçabileceği unutulmamalıdır. GSBL üretiminin sık olarak görüldüğü mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonlu hastaların antibiyotik tedavisine verdiği yanıtlar yakından takip edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Açıköz ZC, Sancak B, Hasçelik G: Hacettepe üniversitesi hastanesi merkez laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen Gram negatif basillerde geniş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin araştırılması, Mikrobiyol Bül 1998;32(4):285-93.
2. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ et al: Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant Enterococcus faecium and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002, Int J Antimicrob Agents 2004; 24(2):119-24.
3. Bradford PA: Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat, Clin Microbiol Rev 2001;14(4):933-51.
4. Bülüç M, Gürol Y, Bal Ç: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları: 2000-2002, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003;33(1):31-4.
5. Çokça F, Tekeli E: çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamazların araştırılması, Mikrobiyol Bül 1998;32(1):1-7.
6. Derbentli Ş, Katrancı H, Nakipoğlu Y: Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması, ANKEM Derg 1996;10(1):1-13.
7. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY: Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disk-diffusion test with other methods for the detection or extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, J Antimicrob Chemother 1998;42(1):49-54.
8. Jacoby GA, Han P: Detection of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, J Clin Microbiol 1996;34(4):908-11.
9. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum beta-lactamase conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns, Rev Infect Dis 1988;10(4):867-78.
10. Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, Clin Microbiol Rev 1995;8(4):557-84.
11. Livermore DM, Yuan M: Antibiotic resistance and production of extended spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe, J Antimicrob Chemother 1996;38(3):409-24.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3, NCCLS, Villanova (1993).
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-sixth edition: Approved standard M2-A6, NCCLS, Villanova, PA (1997).

14. Navon-Venezia S, Hammer-Munz O, Schwartz D, Turner D, Kuzmenko B, Carmeli Y: Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests, *J Clin Microbiol* 2003;41(1):155-8.
15. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pasha A: Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar, *Flora* 2001;6(Ek 1):3-23.
16. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K: Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology, *J Clin Microbiol* 2004;42(1):269-75.
17. Tenover FC, Raney PM, Williams PP et al: Evaluation of the NCCLS extended spectrum β -lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE, *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3142-6.
18. Thomson KS, Sanders CC: detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double disk and three dimensional tests, *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9):1877-82.
19. Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, Goossens H: Comparison of screening methods for detection of extended spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital, *J Clin Microbiol* 1997;35(9):2195-7.
20. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N: Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region, *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl 2):94-103.