

Çoğul Antibiyotik Dirençli Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz Yapan *Salmonella paratyphi B* Suşları

M.Haluk Vahaboğlu, Lütfiye Mülazımoğlu, Senay Dodanlı, İpek Yıldırım, Banu Taşer, Vildan Avkan, İlnur Erdem

Özet: Genişlemiş spektrumlu (extended broad-spectrum) β -laktamazlar (EBS Bla) üçüncü kuşak sefalosporinlere ve monobaktamlara direnç oluşturlar ve çoğu kez hastane kaynaklı *Klebsiella* ve *Enterobacter* gibi cinslerde saptanır. Şimdiye değin *Salmonella* suşları arasında yalnız *S.wien* ve *S.mbandaka*'nın EBS Bla yaptığı bildirilmiştir. Bu yazıda İstanbul Boğaziçi'nin iki ayrı yakasında, birisi hastane kaynaklı yenidoğan menenjitli, öteki toplumda edinilmiş gastroenteriti olan iki ayrı vakadan izole edilmiş ve EBS Bla yaptığı ilk kez saptanan iki *S.paratyphi B* suşu bildirilmektedir. Bu çalışmada suşların antibiyotik direnç özellikleri, biyotipleri, serotipleri ve genetik özellikleri araştırılmıştır. Bulgular, iki suşun özdeş olduğunu ve EBS Bla enzimini kodlayan dizinin aktarılabılır bir genetik eleman, bir transpozon üzerinde ve kromozomda yer alıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bir metropolde toplum içinde epidemiler yapabilen *Salmonella* suşlarında böyle çoğul direnç genlerinin bulunmuş olması, konu üzerinde dikkatle durulmasını gerektirmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Salmonella paratyphi B*, plazmid, transpozon, genişlemiş spektrumlu β -laktamaz.

Summary: Extended broad-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella paratyphi B* strains. Two extended broad-spectrum β -lactamase (EBS Bla)-producing *Salmonella paratyphi B* strains were isolated at the both sides of Bosphorus, one from a nosocomial neonatal meningitis and the other from a patient with community-acquired gastroenteritis. EBS Bla enzymes confer resistance to third generation cephalosporins and monobactams, and are mostly detected among nosocomial strains of *Klebsiella* and *Enterobacter*. To our knowledge there are only two reports on *Salmonella* serotypes producing EBS Bla enzyme, *Salmonella wien* and *Salmonella mbandaka*. This is the first report of a *S.paratyphi B* strain producing EBS Bla. In this study the antibiotic resistance, biotypes, serotypes and genetic characteristics of the enzyme were evaluated. Data obtained from this study indicated that two strains are indistinguishable and the enzyme are possibly encoded on a transposon which is probably located on chromosome. This finding is pointing out a potential danger of a transposable genetic element for Istanbul.

Key Words: *Salmonella paratyphi B*, plasmid, transposon, extended-broad spectrum β -lactamase.

Giriş

Gram-negatif çomaklar üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (extended broad-spectrum β -lactamase, EBS Bla) olarak adlandırılan enzimleri üreterek direnç geliştirmektedirler. İlk kez 1981 yılında Almanya'dan bildirilen bu enzimler geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile seçilip yayılmaktadır (1). Plazmid ya da transpozon gibi aktarılabilen genetik elemanların üzerinde bulunan genetik dizilerce kodlanan ve çoğu kez *Klebsiella* ya da *Enterobacter* gibi hastane bakterilerinde rastlanan bu tür direnç, *Salmonella* cinsi içerisinde sadece *Salmonella wien* ve *Salmonella mbandaka* suşlarında bildirilmiştir (2-3). Neonatal sepsis, paratifo ve gastroenterit gibi değişik klinik tablolara yol açan *Salmonella paratyphi B* toplum içinde epidemiler de yapabilen bir bakteridir. Bu yazıda İstanbul'un iki ayrı yakasında izole edilmiş ve EBS Bla yaptığı ilk kez gösterilen iki *S.paratyphi B* suşunun direnç özellikleri bildirilmektedir.

Yöntemler

İstanbul Boğaziçi'nin iki ayrı yakasındaki iki hastanede biri hastane kökenli, diğeri toplumdan kazanılmış iki ayrı infeksiyondan her ikisi de EBS Bla yapan *S.paratyphi B* suşları izole edildi. Hastane infeksiyonuna neden olan suş, bir yenidoğan yoğun bakım biriminde sepsis ve menenjit etkeni olarak, toplumdan kazanılan suş ise gastroenterit etkeni olarak izole edilmiştir.

Suşların biyotiplendirimi API 20E (bioMerieux) ile; serotiplendirimi anti-O ve anti-H1 ve H2 antiserumları (Behring) ile yapıldı ve Ankara Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsünde doğrulanarak suşlar koleksiyona alındı.

Transkonjugasyon, logaritmik üreme fazındaki alıcı ve verici suşun agar üzerinde eşit miktarlarının karıştırılarak üretilmesi ve ertesi gün nalidiksik asid (100 μ g/ml) + seftazidim (64 μ g/ml) ya da nalidiksik asid + ampicilin (64 μ g/ml) içeren besiyerinde seçilmesi ile yapıldı. İki aşamalı transkonjugasyon ise pU28 plazmid taşıyan *E.coli* suşu ile *S.paratyphi B*'nin eşleştirilmesi ve tetrasiklin (32 μ g/ml) + seftazidim (64 μ g/ml) içeren besiyerinde seçilmesinden sonra yapıldı. pU28 plazmidini alan *Salmonella* suşları ile *E.coli* J 53-1 arasındaki transkonjugasyon aşağıda özetlendiği gibi yapıldı.

İki ayrı tüpte LB buyyonuna ekilen tetrasikline dirençli (TeR) *S.paratyphi B* suşları, yani pU28 plazmidini almış suşlar, *E.coli* J 53-1 ile logaritmik üreme fazında iken eşit miktarlarda karıştırılarak LB buyyonuna, Mueller-Hinton agarına (Difco) ve bir de 64 μ g/ml seftazidim + 100 μ g/ml nalidiksik asid içeren besiyeri olmak üzere üç ayrı besiyerine ekildi. Daha sonra sıvı besiyerinden her saat başı ve Mueller-Hinton katı besiyerinden (LB buyyonu ile yıkanarak) 18 saat sonra 100 ml alınarak 64 μ g/ml seftazidim + 100 μ g/ml nalidiksik asid içeren besiyerlerine ekildi. On sekiz saat sonra üreyen koloniler tek tek seftazidim + nalidiksik asid içeren besiyerine ekildi. Son pasajda da üreyen bakterilerin antibiyotik direnç özellikleri ve biyotipleri belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testleri NCCLS Document M7-A2 ve M2-A4 önerilerine uyularak yapıldı. Buyyon 20 μ g/lit Ca⁺⁺, 10 μ g/lit Mg⁺⁺ ile zenginleştirildi. Bakterilerin plazmidleri mini-prep yöntemi ile izole edildi. Bu yöntemin modifikasyonu olarak "lizozim" 2 μ g/ml yerine 20 mg/ml kullanıldı ve 5 dakika yerine 15 dakika beklendi. Lizis aşamasından sonra izopropanol ile kuru buz üzerinde presipite edilen plazmid DNA'sı fenol-kloroform ile arındırıldı (4). İzole edilen plazmidler TE tamponunda bir gece bekletilerek % 2 agarozda (mini-jel) 90 v ile yürütüldü. Referans DNA olarak Hind III ile kesilmiş λ DNA kullanıldı.

Tablo 1. Orijinal Suş ve Tek Aşamada Elde Edilen Transkonjugatın MIC Değerleri (µg/ml)

	<i>E. coli</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> J 53-1	<i>S. paratyphi B</i> kontrol	<i>S. paratyphi B</i>	<i>E. coli</i> J 53-1 konj. <i>S. paratyphi B</i>
AMP	2	2	2	1024	1024
SAM	2	2	2	128	128
CTX	0.125	0.125	0.125	256	0.125
CAZ	0.125	0.125	0.125	1024	0.25
SULP	0.125	0.125	0.25	32	2
CFP	0.125	0.125	0.25	256	4
CIP	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
C	0.125	0.125	0.125	512	0.125

AMP: ampisilin, SAM: ampisilin-sulbaktam, CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, SULP: sefoperazon- sulbaktam, CFP: sefoperazon, CIP: siprofloksasin, C: kloramfenikol

Sonuçlar

API 20E ile yapılan biyotiplendirimde *Salmonella* spp. olarak bulunan suşların her ikisinin antijenik formülü O:4,5; H:b,1-2 olarak saptandı. Antibiyotik duyarlılık testi standard disk difüzyon yöntemi ve özel bir disk dizilimi ile yapıldığında her iki bakterinin de EBS Bla yaptığı anlaşıldı. Agar dilüsyon testinde ampisilin (MIC90, 1024 µg/ml), ampisilin-sulbaktam (MIC90, 128 µg/ml), amoksisilin-klavulanik asid (MIC90, 32 µg/ml), kloramfenikol (MIC90, 512 µg/ml), azireonam (MIC90, 1024 µg/ml), sefotaksim (MIC90, 256 µg/ml), sefoperazon (MIC90, 256 µg/ml), sefoperazon-sulbaktam (MIC90, 32 µg/ml) ve seftazidim (MIC90, 1024 µg/ml)'e direnç saptandı (Tablo 1). Suşlar, disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde siprofloksasin ve imipeneme duyarlı, aminoglikozid antibiyotiklere ise dirençli bulundu.

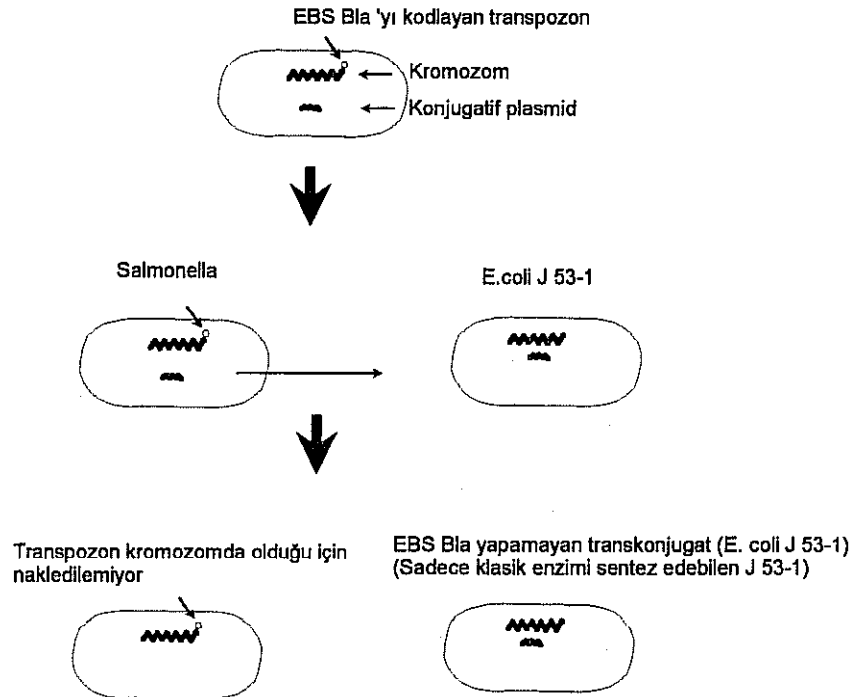
Tek turda transkonjugasyon yapılan *E. coli* J 53-1'de sadece ampisilin direnci (MIC90, 1024 µg/ml) (AmpR) saptandı. Bu transkonjugatın EBS Bla genini almadığı düşünüldü (Şekil 1). Bu deney aynı zamanda *S. paratyphi B*'nin iki ayrı enzim sentez ettiğini ve tek tur transkonjugasyon ile ampisilin direncinin geçtiğini göstermekteydi. Bu transkonjugasyon ile geçen enzim geniş spektrumlu klasik enzimlerden TEM-1 olabileceği düşünüldü.

EBS Bla'yı kodlayan genetik dizinin tek tur transkonjugasyonda geçmemesi bu genetik dizinin konjugatif bir plazmid üzerinde olduğunu düşündürdü. Bu durumu aydınlatmak için *S. paratyphi B*'nin ve AmpR *E. coli* J 53-1'in plazmidleri izole edilerek incelendi. Her iki bakteride de aynı bandlar görüldü. Yani *S. paratyphi B*'nin plazmidleri geçmiş, fakat EBS Bla sentezi olmuyordu. AmpR duruma gelmiş olan *E. coli* kloramfenikol ve aminoglikozidlere duyarlılığını korumaktaydı. Bu da EBS Bla'yı kodlayan genetik lokusun çoğul direnç kodlayan bir genetik eleman üzerinde olduğunu düşündürdü. En akla yakın olasılık EBS Bla'nın çoğul direnç kodlayan bir transpozon üzerinde ve bu transpozonun da kromozomun üzerinde lokalize olabileceğiydi.

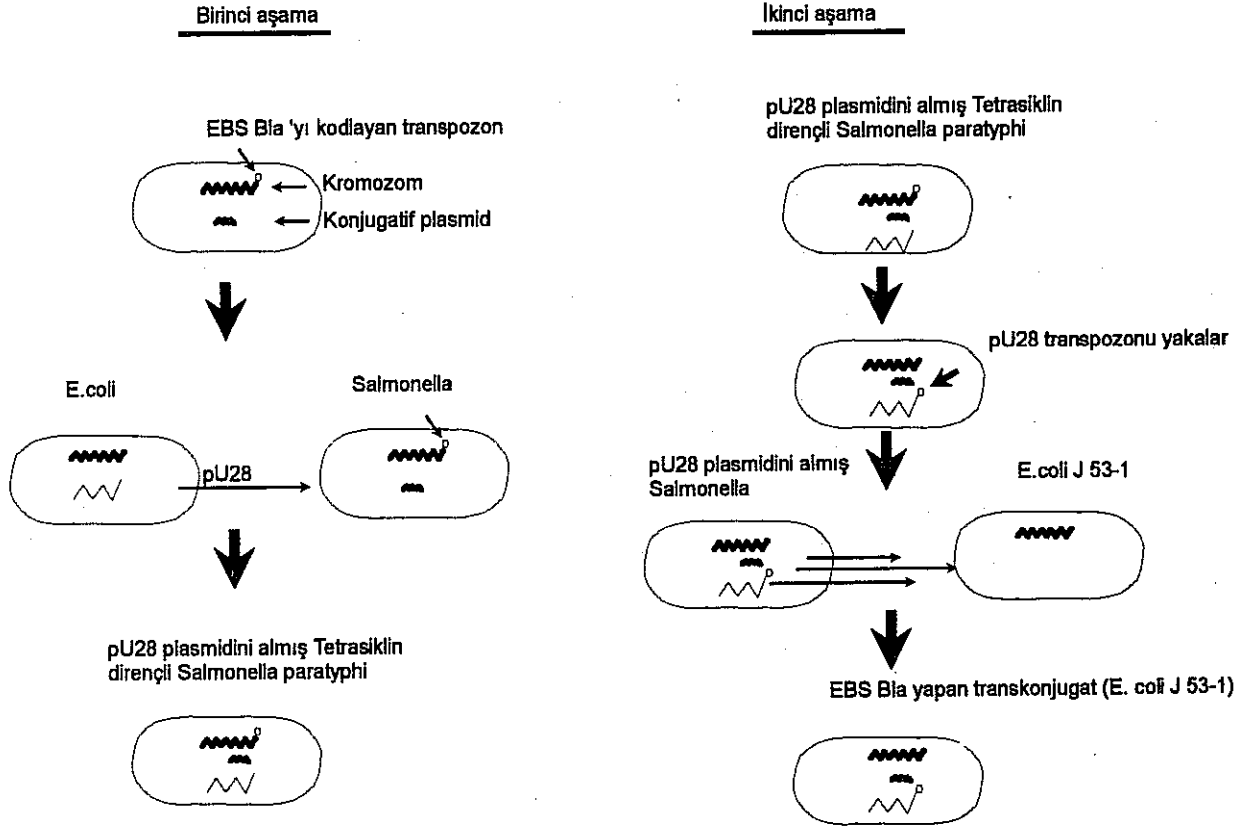
Kromozom üzerinde yer alan transpozonun *E. coli* J 53-1'e aktarılması için transpozon yakalayıcı bir başka plazmid olan pU28 kullanıldı. Bu plazmidin özelli-

ği transpozon yakalayabilme kapasitesine sahip olmasıdır. pU28 plazmidini taşıyan bir *E. coli* suşu ile *S. paratyphi B* arasında transkonjugasyon deneyleri yapıldı. pU28 plazmidini tetrasiklin direnci kodlamaktaydı. Bu da tetrasikline duyarlı *S. paratyphi B* ile transkonjugasyon ve daha sonra antibiyotikli ortamda (tetrasiklin + seftazidim) transkonjugatı, yani pU28 plazmidini almış ve tetrasikline dirençli hale gelmiş *S. paratyphi B* suşunu seçmeye olanak veriyordu. LB buyyonunda ayrı ayrı (*Salmonella* ve pU28 taşıyan *E. coli*) üretilen bakteriler logaritmik üreme fazında iken eşit miktarlarda Mueller-Hinton agarına ekildi ve ertesi sabah yıkanarak toplanan bakteriler tetrasiklin + seftazidimli besiyerinde seçildiler. Böylece elimizde pU28 plazmidini almış *Salmonella* suşu oldu. Amaç, bu plazmidin *Salmonella*'nın kromozomuna tutunmuş olduğu varsayılan transpozonu yakalamasıydı.

Transpozonu alan pU28, konjugatif bir plazmid olduğu için kolaylıkla tekrar *E. coli* J 53-1'e geçirilebilecekti. Transkonjugasyon bu kez pU28 taşıyan *Salmonella* ve *E. coli* J 53-1 arasında yapıldı. LB buyyonunda ayrı ayrı üretilen bakteriler direkt antibiyotikli (seftazidim + nalidiksik asid) agara, antibiyotiksiz agara ve LB buyyonuna ekildi. LB buyyonundan da her saat başı antibiyotikli agara ekim yapıldı. Antibiyotikli agara direkt yapılan ekimler ve LB buyyonunda 1-2 saat inkübe edilerek yapılan ekimlerde EBS Bla yapan transkonjugatlar elde etmek mümkün oldu (Şekil 2). İki turda yapılan bu transkonjugasyon işlemi sonucu TetR *Salmonella* (pU28 taşıyan) ve EBS Bla yapan *E. coli* J 53-1 elde edilmiş oldu. Bu iki bakterinin de plazmidleri izole edilip agaroz jelde yürütüldüğünde AmpR *E. coli* ile EBS Bla yapan *E. coli* arasında plazmid açısından pU28 dışında fark olmadığı görüldü (Şekil 3). Yani ampisilin direnci geçen, fakat EBS Bla yapamayan trans-



Şekil 1. Tek aşamalı transkonjugasyon. *E. coli* J 53-1 sadece konjugatif plazmidini alıyor; EBS Bla'yı kodlayan transpozon alınmıyor.



Şekil 2. pU28 ile yapılan iki aşamalı transkonjugasyon.

konjugatif plazmidleri ile EBS Bla yapan transkonjugat arasındaki tek farkın pU28 olması, EBS Bla'yı kodlayan genetik dizinin bu plazmid üzerinde olduğu anlamına geliyordu. Bu da EBS Bla'yı kodlayan genetik dizinin bir transpozon üzerinde ve bu transpozonun da kromozom üzerinde olduğu varsayımını destekliyordu.

Mutlaka transkonjugat elde etmek istememizdeki amaçlardan biri, bu enzimi kodlayan genetik dizinin antibiyotik direnci bilinen bir bakteride oluşturacağı değişiklikleri görmek, yani EBS Bla'nın etkisini anlamaktır. *Salmonella* suşundaki üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama olan direnç ya da kloramfenikole olan direnç enzim sentezi dışında geçirgenlik azalması ya da hedef noktanın mutasyonu ile de olabilirdi. Oysaki genetik lokus, direnci önceden bilinen bir bakteriye geçince gerçekte sadece

kendisine ait olan direnci sergileyecek ve *Salmonella* suşunun yapısal özelliklerinden kaynaklanan faktörler ortadan kalkmış olacaktır.

EBS Bla sentezleyen transkonjugatın mikrobuyyon dilüsyon testi ile antibiyotik direnci araştırıldığında antibiyotiklerin MIC değerleri: sefotaksim (256 µg/ml), seftazidim (1024 µg/ml), aztreonam (512 µg/ml), ampisilin (1024 µg/ml) ve amoksisilin-klavulanik asit (2 µg/ml) olarak bulundu (Tablo 2).

Özet olarak bu *S.paratyphi B* suşu, en az iki enzim sentez etmektedir. Bunlardan biri, klasik geniş spektrumlu enzim (muhtemelen TEM-1) diğeri de bir EBS Bla'dır. EBS Bla'nın seftazidimi sefotaksimden daha fazla etkilemesi ve sulbaktamdan (sefoperazon-sulbaktam duyarlılığı disk difüzyon ile bakıldı) etkilenmesi bu enzimin bir TEM kökenli seftazidimaz olduğunu düşündürmektedir. Geniş spektrumlu klasik enzim konjugatif bir plazmid üzerinde yer almaktadır. EBS Bla'yı kodlayan genetik dizi ise kromozom üzerinde lokalize bir transpozonda (kloramfenikol + aminoglikozid antibiyotiklere de direnç kodlayan, yani çoğul direnç kodlayan bir transpozon) yer almaktadır. Çoğul direnç kodlayan bir transpozon olması, bunun basit bir mutasyonla oluşmadığını, muhtemelen başka bakterilerden alınmış olduğunu düşündürmektedir.

İstanbul'un iki ayrı yakasından izole edilen *S.paratyphi B* suşlarının aynı olduğunu göstermek epidemiyolojik açıdan çok önemlidir. Bu amaçla her iki suşun antibiyotik direnç özellikleri, biyotipleri ve plazmidleri incelendi. Antibiyotik direnç özellikleri hem orijinal suşta hem de transkonjugatlarda aynı bulundu. İki bakterinin de API 20E ile yapılan testleri aynı bulundu. Her iki suş da iki enzim yapıyordu ve EBS Bla ancak iki tur transkonjugasyon ile geçebiliyordu. Plazmidleri birlikte yürütüldüğünde aynı oldu-

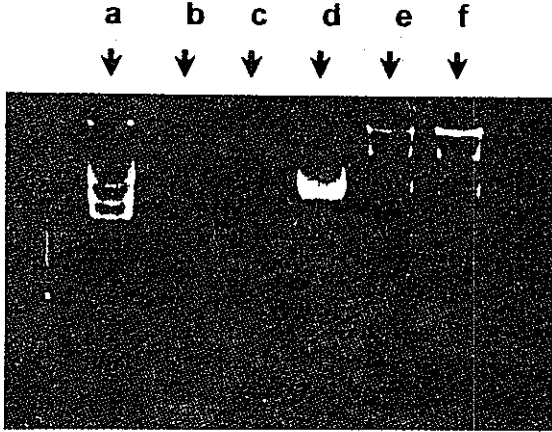
Tablo 2. Orijinal Suşların ve EBS Bla Yapan Transkonjugatın MIC Değerleri

	CTX	CAZ	ATM	AMP	AMC
B.G	256	1024	1024	1024	32
D.M	256	1024	1024	1024	32
J 53-1	2	2	2	2	2
<i>E.coli</i> pU28	2	2	2	2	2
<i>E.coli</i> 2 Tkj.*	256	1024	512	1024	2
<i>E.coli</i> 1 Tkj.**	2	2	2	1024	1

CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, ATM: aztreonam, AMP: ampisilin, AMC: amoksisilin-klavulanik asit; B.G.: Bu addaki hastadan izole edilen *S.paratyphi B* D.M.: Bu addaki hastadan izole edilen *S.paratyphi B*.

*: B.G.'den izole edilen *Salmonella* ile 2 tur transkonjuge olmuş *E.coli* J 53-1.

** : B.G.'den izole edilen *Salmonella* ile 1 tur transkonjuge olmuş *E.coli* J 53-1



Şekil 3. Mini-prep metodu ile izole edilmiş plazmidler.

Kuyu a: λ DNA Hind III ile kesilmiş marker; kuyu b: 1. *Salmonella* suşu; kuyu c: 2. *Salmonella* suşu; kuyu d: ampisilin direncini almış *E. coli* (transkonjugat); kuyu e: pU28'i almış *Salmonella* suşu; f: sefotaksime dirençli *E. coli* (transkonjugat)
Bulgular [1] her iki *Salmonella* suşunun plazmidleri aynı boyutlarda; [2] sefotaksim ve ampisiline dirençli *E. coli* suşlarının plazmidleri aynı boyutlarda; [3] ampisiline dirençli *E. coli* ile *Salmonella* suşu arasında plazmid açısından fark yok.

ğu görüldü (Şekil 3). Tüm bu kanıtlar her iki bakterinin de aynı suş olduğunu gösteriyordu.

İrdeleme

Mikroorganizmalar β -laktamaz adı verilen enzimler üreterek β -laktam antibiyotiklere direnç geliştirirler. Bugüne kadar elliden fazla β -laktamaz bildirilmiştir (5). Bu enzimler enzim-substrat profili, izoelektrik nokta ve klavulanik asid ile inhibe olmasına göre sınıflandırılmaktadır. En yaygın kullanılan sınıflama Karen Bush'un 1989 yılında yaptığıdır (6). Bu sistemde klavulanik asidle inhibe olma özelliği ve enzim-substrat profili ön planda tutulmaktadır. Bu enzimleri kodlayan genetik diziler kromozomal olabileceği gibi plazmid ya da transpozon gibi hareketli ve aktarılabilir genetik elemanlar üzerinde de olabilir (7). Üçüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamlar klasik β -laktamazlara dayanıklıdır. TEM-1, TEM-2 ya da SHV-1 olarak adlandırılan klasik enzimler Gram-negatif enterik çomaklarda sık görülür ve plazmid kaynaklıdır. Etki spektrumu genişletilmiş yeni sefalosporinlerin kullanıma girmesi ile EBS Bla üreten bakteriler görülmeye başlanmıştır. Bu değişim çoğu kez klasik enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarının seçilmesi ile olmaktadır (8).

İlk kez 1983 yılında Almanya'dan sefotaksim ve diğer yeni sefalosporinlere direnç oluşturan bir enzim bildirilmiş ve on yıl içerisinde bu enzimler dünyanın her yerinde görülür olmuştur (9). Bu kadar hızla yayılan yeni β -laktamazlar çoğu kez bir transpo-

zon üzerinde yer almakta ve çoğul direnç genleri ile birlikte yayılmaktadır (10). İzole ettiğimiz *S. paratyphi B* suşundaki EBS Bla genleri de kloramfenikol ve aminoglikozid direnciyle birlikte yayılmaktadır. Bu da *Salmonella* infeksiyonlarında kullanılan ampisilin, üçüncü kuşak sefalosporinler ve kloramfenikol gibi ilk seçilecek ilaçları etkisiz kılmaktadır. *S. paratyphi B*'de ilk kez bildirilen böyle aktarılabılır bir direnç geninin toplum kökenli bir suşa adapte olmuş olması ülkemiz için ayrı bir önem taşımaktadır. Bu çoğul direnç kodlayan genetik eleman kolaylıkla diğer *Salmonella* suşlarına da geçebilir. İkinci bakterinin birinci ile tümüyle ilgili bir yerden izole edilmesi İstanbul'da bu suşun epidemiyolojik açıdan önemli olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarının da gösterdiği gibi mutlaka antibakteriyel direnç bilincinin yerleşmesi ve direncin anlamlı sürveyansının yapılması ve elde edilen bilgilerin antibiyotik kullanım politikalarına dönüştürülmesi gerekmektedir. Böyle *Salmonella* infeksiyonlarının empirik tedavisinde siprofloksasin seçilebilir; kültür ve antibiyotik duyarlık testlerinin sonuçlarına göre tedavi tekrar gözden geçirilmelidir. Hastane personeli arasında mutlaka *Salmonella* taşıyıcılığı yönünden incelemeler yapılmalıdır. Hastane personeli olan taşıyıcılar antibiyotik baskısı altındaki suşlarla kolonize olmaktadır. Bu bakterilerin direnç genleri ise taşıyıcının gastrointestinal sisteminde başka bakterilere de kolaylıkla yayılabilmektedir.

Kaynaklar

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature (London)* 1940; 146:837
2. Hammami A, Arlet G, Benn Redjeb S, Grimont F, Ben Hassen A, Reki A, Philippon A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* wien producing SHV-2 β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 641-6
3. Poubart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from *Salmonella* mbandaka isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1498-500
4. Leonard GD. Plasmid "mini-prep" method. In: Leonard GD, ed. *Basic Methods in Molecular Biology*. New York: Elsevier, 1986: 102-4
5. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-1704
6. Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 259-63
7. Hopkins JD, Flores A, Pilar-Pla M, Lester S, O'Brien T. Nosocomial spread of an amikacin resistance gene on both a mobilized, nonconjugative plasmid and a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1605-11
8. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 879-84
9. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalin HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella* with extended spectrum β -lactamases at a Turkish university hospital. *J Hosp Infect* 1992; 22: 163-78
10. Chanal CM, Sirot DL, Petit A, Labia R, Morand A, Sirot JL, Cluzel RA. Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationship between the responsible plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1915-20