

Kan İzolatı *E.coli* ve *K.pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz, KPC-Tip Karbapenemaz ve Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması*

Investigation of the Presence of Extended Spectrum Beta-Lactamase, KPC-Type Carbapenemase and Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamase in *E.coli* and *K.pneumoniae* Strains Isolated from Blood Cultures

Atakan BAYKAL¹, Nilay ÇÖPLÜ², Hüsniye ŞİMŞEK², Berrin ESEN², Deniz GÜR³

¹ Refik Saydam Hıfızssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Laboratuvarı, Ankara.

¹ Refik Saydam National Public Health Agency, Virology Laboratory, Ankara, Turkey.

² Refik Saydam Hıfızssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara.

² Refik Saydam National Public Health Agency, Department of Communicable Diseases Research, Ankara, Turkey.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Hacettepe University Faculty of Medicine, İhsan Doğramacı Children's Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma GATA Mikrobiyoloji Günleri, Antimikrobiyal Direnç Toplantısında (20-22 Nisan 2010, İstanbul) poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 20.09.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.01.2012

ÖZET

Bu çalışma; ciddi enfeksiyonlara neden olan kan izolatı *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'da görülen genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ile son yıllarda artış gösteren plazmid kaynaklı AmpC (pAmpC) beta-laktamazlar ve KPC-tip karbapenemazın varlıklarını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Ocak 2001-Mart 2009 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastalıkları Hastanesine başvuran hastaların kan örneklerinden izole edilen 99 *E.coli* ve 114 *K.pneumoniae* suşu çalışmaya alınmıştır. GSBL, pAmpC beta-laktamaz ve KPC-tip karbapenemaz enzimleri için tarama testleri aynı plakta uygulanmıştır. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda doğrulama testi olarak GSBL için kombine disk yöntemi, KPC-tip karbapenemaz için modifiye Hodge testi, ayrıca KPC-tip karbapenemaz, pAmpC beta-laktamaz için boronik asitli inhibisyon test yöntemi ve pAmpC beta-laktamazlar için modifiye Hodge testi uygulanmıştır. Her üç tip direncin birarada bulu-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Atakan Baykal, Refik Saydam Hıfızssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Laboratuvarı, Adnan Saygun Caddesi No: 55 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 458 2000, **E-posta (E-mail):** baykalatakan@yahoo.com

nabilmesi durumunda ortaya çıkacak direnç fenotipinin belirlenmesinde boronik asitli inhibisyon test yöntemi uygulanmıştır. *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında beta-laktamaz oranları sırasıyla GSBL için %26.2 (26/99) ve %61.4 (70/114); pAmpC için %1 (1/99) ve %0.9 (1/114); GSBL + pAmpC için %6 (6/99) ve %3.5 (4/114) olarak tespit edilmiştir. Bir suşta GSBL'nin maskelenmiş olduğu saptanmıştır. KPC-tip karbapenemaz için ertapeneme dirençli üç izolat (iki *E.coli*, bir *K.pneumoniae*), boronik asitli inhibisyon testi ile pozitif saptanmalarına karşın, modifiye Hodge testi ile negatif olarak bulunmuştur. CLSI önerileri doğrultusunda modifiye Hodge testi sonuçları geçerli kabul edilmiştir. Bu üç suşun GSBL ve pAmpC için de pozitif olmaları ve modifiye Hodge testi ile negatiflik göstermeleri, ertapenem direncinin başka bir mekanizmadan kaynaklanmış olduğunu düşündürmüştür. Laboratuvar açısından, pAmpC beta-laktamazların ve KPC-tip karbapenemazların rutin testlerle tanımlanabilmeleri için uygun duyarlılık test yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla pAmpC beta-laktamaz için boronik asitli inhibisyon testi, uygulama ve yorumlanması kolay, pratik bir yöntemdir. KPC-tip karbapenemaz için ise CLSI tarafından standardize edilen modifiye Hodge testi uygun bir yöntemdir. Bu çalışmanın bulguları GSBL oranlarının alarm verecek kadar yüksek olduğunu ve pAmpC sıklığının da henüz düşük olmakla birlikte GSBL ile beraber sıklığının artmakta olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, bu konuda acil önlem alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; GSBL; pAmpC beta-laktamaz; KPC-tip karbapenemaz.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL), KPC-type carbapenemase and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase (pAmpC) which have increased in incidence in recent years in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the blood samples causing serious infections. Ninety nine *E.coli* and 114 *K.pneumoniae* strains which were isolated from the blood samples of patients admitted to Hacettepe University Medical Faculty, Ihsan Dogramaci Children's Hospital between January 2001 and March 2009 were investigated. The screening tests for ESBL, pAmpC beta-lactamase and KPC-type carbapenemase were performed on the same plate. Combined disk test was performed for ESBL and modified Hodge test was done for KPC-type carbapenemase confirmation according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. In addition the inhibitory-based test with boronic acid for KPC-type carbapenemase, pAmpC beta-lactamase and the modified Hodge test for pAmpC beta-lactamase were performed. Boronic acid inhibition test was performed to detect the co-presence of the three types of resistance. The frequency of the beta-lactamases in *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates were as follows respectively: ESBL 26.2% and 61.4%; pAmpC 1% and 0.9% and ESBL + pAmpC 6% and 3.5%. ESBL was masked by pAmpC in an isolate. Ertapenem resistance was shown in three isolates and KPC-type carbapenemases were detected positive by the inhibitory-based test with boronic acid but found to be negative by the modified Hodge test. The results of modified Hodge test was considered valid according to CLSI comments. Since both ESBL and pAmpC were positive but modified Hodge test was negative in these three strains, ertapenem resistance was attributed to another mechanism. For the determination of ESBL and pAmpC beta-lactamases in the routine laboratory, reliable and sensitive susceptibility tests should be performed. The inhibitory-based test with boronic acid is easy for interpretation, and a practical method for the determination of pAmpC beta-lactamases. For KPC-type carbapenemases modified Hodge test which has been standardized by CLSI, is a reliable method. The results of this study showed that ESBL positivity rates are alarming and although the frequency of pAmpC is currently low, it is increasing together with ESBL. These data indicated the need for the establishment of urgent measures to control the increase in plasmid-mediated antibiotic resistance in gram-negative enteric bacteria.

Key words: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; extended spectrum beta-lactamase; ESBL; pAmpC beta-lactamase; KPC-type carbapenemase.

GİRİŞ

Escherichia coli ve *Klebsiella pneumoniae*, özellikle üriner sistem enfeksiyonları, septisemi, pnömoni ve nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumludur¹. Bu etkenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde ilk seçenek beta-laktam grubu antibiyotiklerdir. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisi gram-negatif bakterilerin ürettiği beta-laktamaz enzimleridir². Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) klinik olarak önemli enzimlerdir; değişik antibiyotik direnç genlerini içeren büyük plazmidler aracılığıyla taşındıkları için çoklu ilaç direncine neden olurlar ve suşlar arasında kolayca yayılabilirler². "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", GSBL tanısı için sefopodoksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim veya aztreonama azalmış duyarlılık şeklindeki tarama testi ve tek başına ve klavulanik asitli sefotaksim ve seftazidim disklerinin karşılaştırıldığı kombine disk yöntemiyle doğrulama önermiştir³.

AmpC beta-laktamazlar, GSBL'lerden daha geniş bir spektrumda ilaç direncinden sorumlu olmaları nedeniyle klinik olarak önemli bir gruptur. Ayrıca, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez. Plazmid-kaynaklı AmpC (pAmpC) beta-laktamazlar antibiyotik direnç genlerini suşlar arasında kolayca yayarak çoklu ilaç direncine neden olabilir ve GSBL enzimleriyle birarada bulunabilir². Fenotipik testlerde pAmpC enzimlerinin GSBL'lerin açığa çıkmalarını maskeliyor olmaları, GSBL'ye bağlı direnç fenotipini belirlemede bir dezavantaja yol açmaktadır⁴. Boronik asit bileşiklerinin pAmpC beta-laktamazları inhibe edici özellikleri sayesinde, gerek pAmpC enzimlerini gerekse her iki enzim birlikteliğini gösterecek bazı test yöntemleri geliştirilmiştir⁵. Ayrıca, sefoksitin direnci ve sefoksitin diskinde dayalı uygulanan modifiye Hodge testi, pAmpC enzimlerinin tanısında kullanılabilir^{4,6}. Bu testin avantajı aynı plak üzerinde birkaç suşu tanımlama imkanı sağlamasıdır.

GSBL ve pAmpC enzimi taşıyan suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisi her zaman için sorun olmuştur. Karbapenemler, beta-laktamazlara karşı stabil olmaları sayesinde iyi bir seçenektir; ancak son zamanlarda karbapenemlere karşı özellikle gram-negatif basiller arasında artan bir direnç sorunu ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu artışın özellikle GSBL antibiyotiklerin kullanımıyla yakın ilişkili olduğu bilinmektedir⁷. Disk difüzyon testlerinde tarama amaçlı kullanılan karbapenemler, özellikle daha duyarlı olması nedeniyle ertapenem karbapenemaz açısından bir indikatör niteliğindedir, direnç veya zon içi üreme önemlidir⁸⁻¹⁰. CLSI, KPC-tip karbapenemazların tespiti için merkezinde ertapenem diskini kullandığı modifiye Hodge testini önermiştir³. Ayrıca, bazı çalışmalarda bu enzimlerin boronik asit ile inhibe olma özellikleri de araştırılmıştır^{11,12}.

Bu çalışmanın amacı; GSBL'lerle birlikte ya da tek başına bulunabilen pAmpC beta-laktamazlar ile KPC-tip karbapenemazın varlığını kan izolatu *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2001-Mart 2009 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastalıkları Hastanesine başvuran hastaların kan örneklerinin

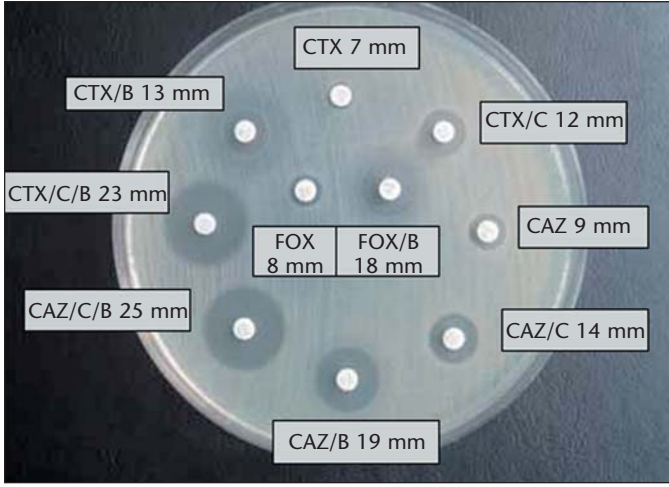
den izole edilen 99 *E.coli* ve 114 *K.pneumoniae* suşu alındı. Testte (a) GSBL tarama ve doğrulama için; seftazidim 30 µg (CAZ), seftazidim + klavulanik asit 30 + 10 µg (CAZ/C), sefotaksim 30 µg (CTX), sefotaksim + klavulanik asit 30 + 10 µg (CTX/C), seftriakson 30 µg (CRO), aztreonam 30 µg (azt); (b) pAmpC beta-laktamaz tarama ve doğrulama için; sefoksitin 30 µg (FOX), sefoksitin + boronik asit (FOX/B), (c) GSBL/pAmpC birlikteliği için; seftazidim + klavulanik asit + boronik asit (CAZ/C/B) ve sefotaksim + klavulanik asit + boronik asit (CTX/C/B); (d) KPC-tip karbapenemaz tarama ve doğrulama için; mero-penem 10 µg (MEM), ertapenem 10 µg (ETP), ertapenem + boronik asit (ETP/B) antibiyotik diskleri (BBL, Ankara) ve benzenboronik asit (benzeneboronic acid Merck 10 g, İstanbul) bileşiği kullanıldı.

Benzenboronik Asit Solüsyonunun Hazırlanışı

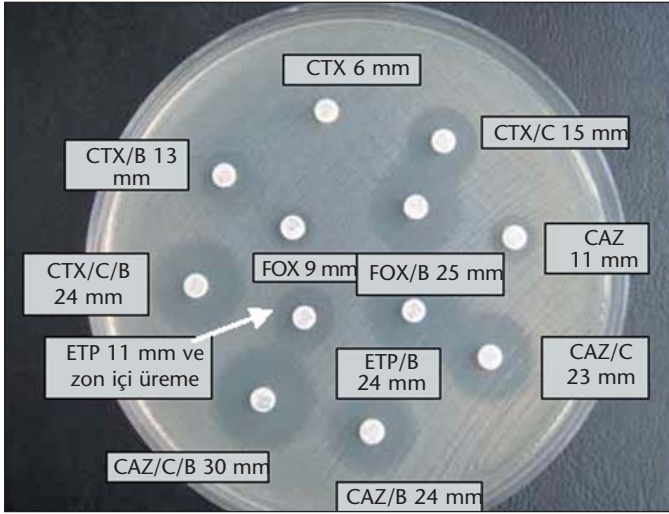
120 mg benzenboronik asit 3 ml dimetil-sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldükten sonra üzerine 3 ml steril distile su eklenerek stok solüsyon hazırlandı. Diskteki miktarı 400 µg boronik asit olacak şekilde 20 µl stok solüsyondan alınmış sefoksitin, ertapenem ve kombine disklere emdirildi ve diskler oda ısısında 30 dakika kurutulduktan sonra steril bir tüp içinde derin dondurucuya kaldırıldı^{5,11}.

CLSI'nın önerileri doğrultusunda izolatların tarama testleri, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerinde yapıldı. Ekimi yapılan plaklar etüvde $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de bir gecelik aerob inkübasyona bırakıldı. Tüm testlerde kontrol için ATCC 25922 *E.coli* ve ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşları kullanıldı. Uyarıcı inhibisyon zon çapı ve daha dar zon çapı gösteren suşlar GSBL açısından³, sefoksitine dirençli (≤ 18 mm) suşlar pAmpC açısından^{6,12}, CLSI'ya göre karbapenemlerden herhangi biri için uyarıcı zon çapları ve altında zon çapı gösteren suşlarla, ertapenem zon içi üreme gösteren suşlar ise KPC-tip karbapenemaz açısından şüpheli olarak değerlendirildi^{3,8}.

Doğrulama testi için, şüpheli suşlar MHA plaklarına ekildikten sonra $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de bir gece aerob inkübasyon için etüve kaldırıldı. pAmpC pozitif kontrol suşu olarak Fransa'dan temin edilen *K.pneumoniae* FOR, DHA-2 ve *E.coli* J53 TC, CMY-2 suşları kullanıldı; ancak KPC-tip beta-laktamazın tespiti için pozitif kontrol suşu temin edilemedi. CAZ/C (veya CTX/C) zon çapının CAZ (veya CTX) inhibisyon zon çapında ≥ 5 mm gösteren suşlar GSBL³, FOX/B diskinin FOX'a göre inhibisyon zon çapının ≥ 5 mm olduğu suşlar pAmpC⁴ (Resim 1), ETP/B diskinin ETP'ye göre inhibisyon zon çapının ≥ 5 mm olduğu suşlar KPC açısından pozitif olarak değerlendirildi¹¹ (Resim 2). FOX/B inhibisyon zon çapının FOX'a göre ≥ 5 mm olduğu suşlar da, CAZ/C (veya CTX/C) inhibisyon zon çapının CAZ'a (veya CTX) göre ≥ 5 mm olup olmadığı açısından incelendi ve GSBL pozitif ise, pAmpC ve GSBL birlikteliği açısından da pozitif olarak değerlendirildi¹³ (Şekil 1). Ayrıca, pAmpC enzimine bağlı olarak maskeleyenin olabileceği düşünülen, yani GSBL tarama testi pozitif ancak GSBL doğrulama testi negatif ve pAmpC doğrulama testi pozitif olan suşlar için değerlendirme şu şekilde yapıldı: CAZ/C/B (veya CTX/C/B diski) inhibisyon zon çapının, CAZ/B'den (veya CTX/B) ve CAZ/B (veya CTX/B) inhibisyon zon çapının da CAZ'dan (veya CTX) ≥ 5 mm olması durumunda, test edilen izolatta pAmpC enzimine bağlı olarak maskelenmiş GSBL varlığı kabul edildi⁵.

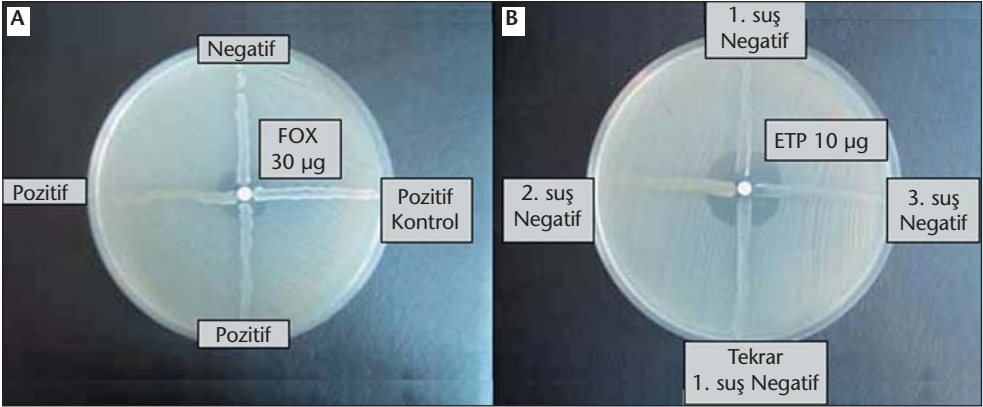


Resim 1. GSBL/pAmpC pozitif suş.



Resim 2. GSBL/pAmpC/KPC pozitif suş.

pAmpC beta-laktamaz ve KPC-tip karbapenemaz açısından pozitif olarak değerlendirilen örneklerle aynı zamanda modifiye Hodge testi uygulandı. Her iki test için, *E.coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0.5'in 1/10 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlandı ve 150 mm'lik MHA plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi ekildi. pAmpC için plağın merkezine sefoksitin diski (FOX 30 µg) yerleştirildi ve bir adet pozitif kontrol suşu olmak üzere dört adet suş bu diskin dört bir kenarından perifer doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekildi⁶ (Resim 3). Aynı şekilde KPC-tip karbapenemaz için plağın merkezine ertapenem diski (ETP 10 µg) yerleştirildi ve boronik asitli inhibisyon testi ile pozitif bulunan üç adet suş bu diskin dört bir kenarından perifer



Resim 3. *pAmpC* beta-laktamaz için MHT (A); KPC-tip karbapenemaz için MHT (B).

doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekildi. 35°C’de bir gecelik aerop inkübasyondan sonra diskin etrafındaki ortalama ≥ 3 mm’lik çarpık inhibisyon zonu varlığı pozitif olarak kabul edildi³⁻⁶ (Resim 3).

BULGULAR

GSBL İçin Kombine Disk Yöntemi Bulguları

GSBL açısından tarama testi ile pozitif bulunan 26 (%26.2) *E.coli* ve 70 (%61.4) *K.pneumoniae* suşunun hepsi GSBL doğrulama testi ile pozitif bulunmuştur.

Boronik Asitli İnhibisyon Testi Bulguları

Tek başına *pAmpC* beta-laktamaz varlığı: Tarama testinde pozitif bulunan bir *E.coli* ve iki *K.pneumoniae* suşunda *pAmpC* varlığı doğrulama testiyle tespit edilmiştir. Ancak bir *K.pneumoniae* suşunda *pAmpC*’nin GSBL varlığını maskeleyiği saptanmıştır. Böylece tek başına *pAmpC* varlığı bir *E.coli* (%1), bir *K.pneumoniae* (%0.9) suşunda tespit edilmiştir.

Tek başına KPC-tip karbapenemaz varlığı: Tarama testinde zon içi üreme gösteren KPC şüpheli bir *E.coli* ve bir *K.pneumoniae* suşu doğrulama testinde enzim varlığı açısından doğrulanmamıştır.

GSBL/*pAmpC* varlığı: Tarama testinde GSBL ve *pAmpC* birlikteliği gösteren dört *E.coli* ve iki *K.pneumoniae* suşu doğrulama testi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, yukarıda ifade edilen bir adet maskelenmiş GSBL enzimi ile birlikte üç adet *K.pneumoniae* suşunda GSBL/*pAmpC* birlikteliği saptanmıştır.

GSBL/*pAmpC*/KPC varlığı: Tarama testleri ile iki *E.coli* ve bir *K.pneumoniae* suşunda GSBL/*pAmpC*/KPC birlikteliği saptanmış, ayrıca *K.pneumoniae* suşunda ertapenem diskinde zon içi üremeler tespit edilmiştir. Suşlar boronik asitli ertapenem diski ile pozitif olarak doğrulanmıştır. Ancak CLSI önerileri doğrultusunda modifiye Hodge testinin sonuçları kabul edildiği için bu sonuç değerlendirilmeye alınmıştır.

Modifiye Hodge Testi Bulguları

pAmpC varlığı: Tarama testi ile pAmpC bulunan yedi *E.coli* ve beş *K.pneumoniae* suşu teste alınmış, 12 adet suşun 11'inde ortalama ≥ 3 mm çarpık inhibisyon zonu görülmüştür. Sadece bir *E.coli* suşunda çarpık inhibisyon zonu görülmemiştir.

KPC-tip karbapenemaz varlığı: Tarama testi ile ertapenem zon içi üreme gösteren ve diğer enzimlerle beraber pozitif bulunan üç *E.coli* ve iki *K.pneumoniae* suşu modifiye Hodge testine alınmış, ancak hiçbiri inhibisyon zonunda belirgin bir çarpıklık göstermemiş ve negatif bulunmuşlardır. CLSI önerileri doğrultusunda bu sonuçlar dikkate alınmıştır (%0). Dolayısıyla GSBL/pAmpC birlikteliği *E.coli* için %6 (6/99) ve *K.pneumoniae* için %3.5 (4/114) olarak tespit edilmiştir.

Tarama ve doğrulama testlerinin sonuçları Tablo I'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Enzimatik direnç içinde önemli bir fenotip gösteren GSBL'ler *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri arasında özellikle *E.coli* ve *K.pneumoniae* türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır¹. Bu enzim ailesi değişik antibiyotik direnç genlerini içeren büyük plazmidler aracılığıyla taşındıkları için çoklu dirence neden olur ve suşlar arasında kolayca yayılabilir. Klinik olarak da önemli enzimlerdir; zira varlıklarının gösterilmesi tedavide kısıtlılığa yol açar². Bu nedenle hastanelerde GSBL salgılayan bakterilerin sıklığının düzenli olarak izlenmesi ve yayılımının önlenmesi gerekmektedir.

E.coli ve *Klebsiella* suşlarında GSBL üretimi dünyanın değişik bölgelerinde farklı sıklıkta ortaya çıkmaktadır. Gerek ülkemizde gerekse yurt dışındaki GSBL oranlarında görülen farklılıklar, bakterilerdeki enzim üretim sıklığının belli şartlarla değişiyor olmasıyla ilgilidir. Ayrıca, enzim üretimindeki artışın GSBL antibiyotik kullanımıyla yakın ilişkili ve beta-laktam direncindeki artışla paralel olduğu bilinmektedir^{10,14}. GSBL tespitine yönelik olarak ülkemizde değişik merkezlerde yapılan çalışmalarda farklı oranlar elde edilmiştir. Mumcuoğlu ve arkadaşları¹⁵ *E.coli*'de %20 (19/94), *Klebsiella* suşlarında %44 (27/62), Delialioğlu ve arkadaşları¹⁶ *E.coli*'de %18.3 (94/514), *K.pneumoniae*'da %29.7 (52/175), Geyik ve arkadaşları¹⁷ *E.coli*'de %32 (10/31), *Klebsiella* suşlarında %45 (15/33) oranlarında GSBL varlığı saptamışlardır. Ancak kan kültürlerinden izole edilen bakterilerdeki GSBL oranları konusundaki çalışmalar yetersizdir; yapılan az sayıda çalışmada GSBL sıklığı bazı merkezlerde *E.coli*'de daha yüksek, bazı merkezlerde ise *K.pneumoniae*'da daha yüksektir. Genel olarak ülkemizde GSBL sıklığı *E.coli*'de %13-36, *Klebsiella* suşlarında ise %60-70 oranlarında değişmektedir. Çalışmamızda, GSBL 26 (%26.2) *E.coli* suşunda ve 70 (%61.4) *K.pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir^{10,18-20}. Bu sonuçlar ülkemizdeki verilerle uyumludur.

E.coli ve *Klebsiella* spp. izolatlarında en sık GSBL enzimlerine rastlanmakla birlikte sefoksitin, sefotetan gibi sefamisinlere direnç sağlayan pAmpC beta-laktamazların önemi her geçen gün artmaktadır. pAmpC beta-laktamazlar, GSBL'lerden daha geniş bir spektrumda ilaç direncine yol açmaları nedeniyle klinik olarak önemli bir gruptur²¹. pAmpC beta-laktamazların dünyadaki dağılımına bakıldığında bu enzimlerin önemi daha iyi an-

Tablo 1. Tarama ve Doğrulama Testlerinin Sonuçları

Direnç enzimleri	Testler	<i>E.coli</i> (n= 99)	<i>K.pneumoniae</i> (n= 114)	Açıklamalar
GSBL	Tarama testi Üçüncü kuşak sefalosporin ve aztreonam	26 (%26.2)	70 (%61.4)	Üçüncü kuşak sefalosporin olarak sefotaksim, seftazidim kullanılmıştır.
pAmpC	Doğrulama testi Klavulanik asit ile	26 (%26.2)	70 (%61.4)	
	Tarama testi Sefoksitin	1 (%1)	2 (%1.7)	
	Doğrulama testi Boronik asit ile	1 (%1)	1* (%0.9)	Tarama testi pozitif bulunan her iki <i>K.pneumoniae</i> suşu da doğrulama testinde pozitif bulunmuştur, ancak ek olarak maskelenmiş GSBL de saptandığı için ilgili kutucuğa yazılmıştır**.
	MHT	Pozitif	Pozitif	
KPC	Tarama testi Ertapenem	1 (%1)	1 (%0.9)	Her iki suşta zon içi üremeler görülmüştür.
	Doğrulama testi Boronik asit	Negatif	Negatif	Zon içi üremeler görülmemiştir.
	MHT	Negatif	Negatif	
GSBL/ pAmpC	Tarama testi Üçüncü kuşak sefalosporin	4 (%4)	2 (%1.7)	
	Sefoksitin			
	Doğrulama testi Boronik asit ile	4 (%4)	3** (%2.6)	Yalnızca bir <i>E.coli</i> suşunda MHT ile negatiflik görülmüştür. Ancak değerlendirmede boronik asit testi geçerli kabul edilmiştir.
	MHT	Pozitif	Pozitif	
GSBL/ pAmpC/ KPC	Tarama testi Üçüncü kuşak sefalosporin	2 (%2)	1 (%0.9)	<i>K.pneumoniae</i> suşunda ertapenem diskinde zon içi üreme görülmüştür.
	Sefoksitin			
	Ertapenem			
	Doğrulama testi Boronik asit	2 (%2)	1 (%0.9)	Boronik asit ile KPC doğrulanmış, MHT ile doğrulanmamıştır. CLSI önerileri doğrultusunda MHT sonuçları geçerli kabul edilmiştir.
	pAmpC, KPC)	Pozitif	Pozitif	
	pAmpC için MHT	Negatif	Negatif	
	KPC için MHT			

* Doğrulama testinde sadece bir *K.pneumoniae* suşunda pAmpC enzimi tek başına pozitif olduğundan sayısı bire inmiştir.

** pAmpC enzimi GSBL ile birlikte bulunduğundan sayı üçe çıkmıştır.

MHT: Modifiye Hodge testi; GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

laşılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda pAmpC oranları *K.pneumoniae*'da %10-30, *E.coli* suşlarında ise %2-40 aralığında değişmektedir²²⁻²⁴. pAmpC enzimleri tek başına bulunabilecekleri gibi GSBL enzimleriyle birlikte de bulunabilir. Bu birliktelikte, laboratuvar testlerinde bazen her iki enzim ailesi fenotipini ayrı ayrı ortaya koyabileceği gibi, bazen pAmpC enzimleri GSBL'lerin ifadesini maskeleyerek saptanmasını önlüyor olabilir. Bu gibi özel durumların açığa kavuşturulması için, GSBL tarama testi pozitif ve sefoksitine dirençli izolatlara pAmpC inhibitörü olan boronik asitin kullanıldığı çalışmalarda GSBL ve pAmpC birlikteliğini gösteren sonuçlar alınmıştır^{4,5,13-26}. Çalışmamızda 6 (%6.0) *E.coli* ve 4 (%3.5) *K.pneumoniae* olmak üzere toplam 10 suшта pAmpC pozitifliği GSBL ile birlikte tespit edilmiş ve bir *K.pneumoniae* suşunda GSBL fenotipi maskelenmiş olarak bulunmuştur. Tek başına pAmpC pozitifliği ise, 1 (%1) *E.coli* ve 1 (%0.9) *K.pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir. Boronik asitli inhibisyon testi yanında modifiye Hodge testi ile de sefoksitin direncinin pAmpC enzimine bağlı olup olmadığı saptanabilir; ancak modifiye Hodge testinin uygulanması hakkında CLSI'nın henüz bir önerisi yoktur. Yong ve arkadaşlarının⁶ çalışmasında MHT testinin performansı değerlendirilmiş, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %100 ve %94.9 olarak saptanmış, ayrıca pAmpC pozitifliği için inhibisyon zon sınırı değeri ≥ 3 mm olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda modifiye Hodge testi, tarama testi ile pAmpC pozitif bulunan tüm suşlarda uygulanmış ve bir suş dışında tümü pozitif olarak saptanmıştır. Aynı suşlarda yapılan boronik asitli inhibisyon testi ile tüm suşlar doğrulanmıştır. Uygulanan her iki yöntem CLSI tarafından önerilmiş olmasa da, çalışma bu yöntemlerin performansını göstermede önemlidir. Gerçekte pAmpC beta-laktamazların varlığını tespit etmede polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) altın standarttır; ancak çalışmamızda, laboratuvar ortamında pratik olan bu yöntemlerin etkinliğinin test edilmesi amaçlandığından PCR yöntemi uygulanmamıştır.

GSBL ve pAmpC enzimi taşıyan suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisi her zaman için sorun olmuştur. Karbapenemler, bu beta-laktamazların hidrolizine karşı stabil olmaları sebebiyle dirençli gram-negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek olmuştur⁷. Ancak son zamanlarda karbapenemlere karşı da direnç sorunu ortaya çıkmaya başlamıştır. KPC-tip karbapenemazının *K.pneumoniae* suşları arasında giderek yayılım göstermeye başladığı, yapılan birkaç çalışmada gösterilmiştir^{11,27-29}. Yunanistan'da yapılan çalışmalarda KPC-2 ile birlikte GSBL enzimleri tespit edilmiştir^{11,27}. Bize yakın bir ülkede KPC enzimi taşıyan suşların görülmesi, ülkemiz açısından risk taşımaktadır. Karbapeneme dirençli suşların yayılımlarını kontrol altına almak için bu enzimin yol açtığı direncin izlenmesi gerekmektedir. Disk difüzyon testlerinde kullanılan karbapenemler, karbapenemaz açısından bir indikatör niteliğinde olup, tarama amaçlı değerlendirilebilir. Özellikle gerek direnç fenotipinin belirlenmesinde gerekse tedavide kullanılmamasından dolayı ertapenemin önemi gittikçe artmaktadır¹⁰. Anderson ve arkadaşları⁸ yapmış oldukları bir çalışmada, 31 KPC pozitif *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenem duyarlılıklarını çeşitli test yöntemleriyle çalışmışlar ve ertapenemi en duyarlı indikatör olarak tespit etmişlerdir⁸. Bunun yanında duyarlılık testlerinde ertapenemin zon içinde ince üremelerinin görülmesi KPC-tip karbapenemaz varlığı açısından uyarıcıdır. Çalışmamızda, tarama testinde iki *E.coli* ve bir *K.pneumoniae* suşunda ertapenem direnci saptanmış-

tır. Ertapeneme direnç gösteren bu suşlar boronik asit ile duyarlı inhibisyon zonu göstermişlerdir. Ayrıca, ertapeneme dirençli *K.pneumoniae* suşunda zon içi üremeler tespit edilmiştir. CLSI ayrıca doğrulama testi olarak, ertapenem diskinin kullanıldığı modifiye Hodge testini tanımlamıştır³. Yöntem, tarama testinde ertapenem direncini teyid etmektedir ve laboratuvarlar için uygulanabilecek kolaylıktadır. Yalnız sonuçların değerlendirilme aşaması deneyim gerektirmektedir¹². Bizim çalışmamızda modifiye Hodge testi, ertapeneme dirençli üç suş için uygulanmış, ancak belirgin bir çarpık inhibisyon zonu elde edilememiştir. Ayrıca, testte KPC için pozitif kontrol suşunun temin edilememesi önemli bir eksikliktir. Buna karşılık testin değerlendirilmesinde bir sorun yaşanmamıştır. Her üç suşun da GSBL ve pAmpC enzimleriyle birlikte bulunması ve modifiye Hodge testi ile negatif bulunması ertapenem direncinin başka bir mekanizmadan kaynaklanmış olduğunu düşündürmektedir.

Günümüzde, GSBL ile birlikte pAmpC enzimlerinin bulunabilmeleri durumunda henüz uygulanabilecek standart bir yöntem yoktur. Bu nedenle son zamanlarda artış gösteren ve GSBL'lerle birlikte bulunabilen pAmpC enzimlerinin rutin testlerle tanımlanmaları için uygun duyarlılıkta test yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu açıdan boronik asitli inhibisyon test yöntemleri, uygulanabilir, yorumlanması kolay ve pratik yöntemlerdir. Ayrıca, CLSI tarafından standardize edilen modifiye Hodge testi, KPC-tip karbapenemazların tespiti için kullanılabilecek uygun bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, et al. (eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Chapter 5-6. 2006, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
2. Gupta V. An update on newer beta-lactamases. Indian J Med Res 2007; 126(5): 417-27.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th Informational Supplement. 2009, M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
4. Hemalatha V, Padma M, Sekar U, Vinodh TM, Arunkumar AS. Detection of AmpC beta-lactamases production in *Escherichia coli* and *Klebsiella* by an inhibitor based method. Indian J Med Res 2007; 126(3): 220-3.
5. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 4163-7.
6. Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, et al. Further modification of the Hodge test to screen AmpC beta-lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Methods 2002; 51(3): 407-10.
7. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(4): 1151-61.
8. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2723-5.
9. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. J Clin Microbiol 2009; 47(3): 785-6.
10. Tunçcan ÖG, Keten DT, Dizbay M, Hızal K. Hastane kaynaklı *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılığı. ANKEM 2008; 22(4): 188-92.
11. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. J Antimicrob Chemother 2008; 62(6): 1257-60.

12. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pascualle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. J Clin Microbiol 2008; 46(12): 4083-6.
13. Song W, Jeong SH, Kim J, Kim H, Shin DH. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(3): 315-8.
14. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane infeksiyonu etkeni enterobakterilerde duyarlılık ve GSBL sıklığının araştırılması. Süleyman Demirel Üni Tıp Fak Derg 2004; 11(1): 6-9.
15. Mumcuoğlu I, Gündüz T, Baydur H. *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Proteus* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumu. ANKEM 2004; 18(1): 9-11.
16. Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları. ANKEM 2005; 19(2): 84-7.
17. Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Uçmak H, Çelen MK, Hoşoğlu S, Ayaz C. Hastane kaynaklı gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Enfeksiyon Derg 2002; 16(2): 175-8.
18. Al-Muhtaseb M, Kaygusuz A. Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) sıklığı. ANKEM 2008; 22(4): 175-182
19. Ünlü GV, Ünlü M, Bakıcı MZ, Gür D. Kan kültürlerinden soyutlanan gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere direnci ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oranları. Enfeksiyon Dergisi 2003; 17(4): 459-63.
20. Işık F, Arslan U, Tuncer İ. Klinik örneklerden soyutlanan *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve antibiyotik duyarlılığı. Enfeksiyon Dergisi 2007; 21 (1): 33-8.
21. Arora S, Bal M. AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. Indian J Med Res 2005; 122(3): 224-33.
22. Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L. The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(10): 915-21.
23. Subha A, Devi VR, Ananthan S. AmpC beta-lactamase producing multidrug resistant strains of *Klebsiella* spp. and *E.coli* isolated from children under five in Chennai. Indian J Med Res 2003; 117(1): 13-8.
24. 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(5): 1791-6.
25. Yan J, Hsueh P, Lu J, Chang F, et al. Extended-spectrum beta-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(5): 1861-4.
26. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1180-4.
27. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). J Infect 2009; 58(3): 213-9.
28. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(2): 763-5.
29. Sundin DR. Hidden beta-lactamases in the *Enterobacteriaceae* - Dropping the extra disks for detection, Part II. Clin Microbiol Newsletter 2009; 31(7): 47-52.