

## Sefoksitine Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Tespiti

### Detection of Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamase in Clinical Isolates of Cefoxitin-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Serpil COŞKUN, Nurten ALTANLAR

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.  
Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.08.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 08.03.2012

#### ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) veya AmpC beta-laktamaz sentezleyen izolatlar laboratuvarında geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı yanlışlıkla duyarlı olarak rapor edilebilmektedir. Sınıf A (GSBL) ve sınıf B (MBL) beta-laktamazların tespiti için tarama ve doğrulama yöntemleri yayınlandığı halde AmpC beta-laktamazların tespiti için bugüne kadar bir yöntem yayınlanmamıştır. Bu çalışmada, AmpC beta-laktamazları tespit etmek için uygulanan üç farklı fenotipik yöntemin [boronik asit (BA)-klavulanik asit (CA) ile inhibisyon testi, TRIS-EDTA'lı AmpC disk testi ve modifiye üç boyutlu test (M3BT)] performanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Haziran-Eylül 2009 tarihleri arasında sefoksitine dirençli 50 (42'si *Escherichia coli*, sekizi *Klebsiella pneumoniae*) klinik izolat toplanmıştır. Plazmid aracılı AmpC laktamazlar DHA, EBC, CIT, FOX ve MOX primerlerinin kullanıldığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genotipik olarak doğrulanmıştır. Sefoksitine dirençli 50 izolatın 25 (%50)'i BA-CA testiyle AmpC pozitif olarak bulunmuştur. BA-CA ile AmpC pozitif bulunan 25 izolatın 22 (%88)'si multipleks PCR ile pozitif sonuç vermiştir. PCR ile AmpC pozitif bulunan izolatların hepsi CIT (CMY-2 ile CMY-7 arası, LAT-1 ile LAT-7 arası ve BIL-1 AmpC beta-laktamazların bulunduğu grup) ailesine ait AmpC beta-laktamazlardır. İzolatların birinde hem CIT hem de EBC tipi AmpC enzim, birinde de CIT + MOX + GSBL birlikte görülmüştür. Bu çalışmada DHA ve FOX tipi AmpC ailesine ait beta-laktamaz tespit edilememiştir. AmpC enzim sentezleyen 21 izolatın (AmpC disk testi ve M3BT'nin uygulanmadığı PCR pozitif bir izolat hariç) 11 (%52.3)'ünde AmpC disk testi ve M3BT pozitif olarak bulunmuştur. CA ile inhibisyon testine BA ilave edildikten sonra AmpC enziminin BA ile inhibisyonuna bağlı olarak GSBL sayısı 13'ten 14 (%63.6)'e çıkmıştır. Ayrıca 3-aminofenilboronik asit ile negatif sonuç veren izolatlar, benzenboronik asit ile tekrar test

**İletişim (Correspondence):** Uzm. Dr. Serpil Coşkun, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 203 3190, **E-posta (E-mail):** srpl50star@gmail.com

edilmiş; üç izolatta daha benzenboronik asit ile pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuca göre, BA inhibisyon testinde kullanılan benzenboronik asit veya 3-aminofenilboronik asit ile ilgili daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, AmpC beta-laktamazın fenotipik olarak tespiti için BA-CA testi, uygulanması basit ve yorumu kolay bir testtir. Kısaca, GSBL'nin AmpC beta-laktamazları maskeleyerek yanlış sonuç vermesini önlemek için BA inhibisyon testine CA eklenmelidir. AmpC beta-laktamazların GSBL'yi maskeleyerek yanlış sonuç vermesini önlemek için de CA inhibisyon testine BA eklenmelidir.

**Anahtar sözcükler:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; inhibitör temelli test; plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz; *K.pneumoniae* karbapenemaz.

## ABSTRACT

Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) or AmpC beta-lactamases may be associated with false cephalosporin susceptibility results. Although there are well-established methods for screening and confirmation of class A (ESBL) and class B metallo-beta-lactamases (MBL), there is no current guideline for the detection of AmpC beta-lactamases. The aim of this study was to evaluate the performances of three different phenotypic tests [boronic acid (BA) - klavulanik asit (CA) inhibition test, AmpC disk test (TRIS-EDTA impregnated), modified 3-dimensional test (M3DT)] for the detection of AmpC beta-lactamases. A total of 50 (42 were *Escherichia coli* and eight were *Klebsiella pneumoniae*) cefoxitin-insusceptible strains were collected during June-September 2009. Multiplex PCR was used as the genotypic confirmation test by using DHA, CIT, MOX, FOX and EBC primers. Twenty-five (50%) of 50 cefoxitin-insusceptible strains yielded positive result by BA-CA test. Twenty two (88%) of 25 BA-CA positive strains yielded positive result by multiplex PCR and all of them belonged to CIT family (CMY-2 to CMY-7, LAT-1 to LAT-4 and BIL-1 type) of AmpC beta-lactamases. One strain harboured both CIT and EBC family of AmpC beta-lactamases, one strain harboured CIT + MOX + ESBL. DHA and FOX family of AmpC beta-lactamases were not detected in this study. Both AmpC disk test and M3DT yielded positive test with 11 (52.3%) of 21 AmpC enzyme producing strains (except for one of the PCR positive strain which couldn't be screened by M3DT and AmpC disk test). When BA was added to CA inhibition test, the number of positive isolates of ESBL increased from 13 to 14 (63.6%) due to inhibition of AmpC with BA. However, the strains which yielded negative results by 3-aminophenylboronic acid (3-APB) were tested again by benzenboronic acid. Three strains were also found to be positive with benzenboronic acid. The results of this study indicated that BA test with benzene boronic acid or 3-APB warranted further study. In conclusion, for the phenotypic detection of AmpC beta-lactamases, BA-CA test is simple to perform and easy to interpret. Briefly, in order to prevent the masking effect of ESBL, CA must be added to the BA inhibition test. Also in order to prevent the masking effect of AmpC beta-lactamases on ESBL detection, BA must be added to the CA inhibition test.

**Key words:** Extended spectrum beta-lactamase; inhibitor based test; plasmid-mediated AmpC beta-lactamase; *K.pneumoniae* carbapenemase.

## GİRİŞ

Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerinden daha geniş spektrumdaki beta-laktam antibiyotiklere dirençten sorumludur. GSBL'ler oksiiiminosefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz ederken, 7- $\alpha$ -metoksi-sefalosporinlere (sefamisinler; sefoksitin, sefotetan) etki etmez. AmpC beta-laktamazlar ise bu grup enzimlerden farklı olarak sefamisinleri de hidroliz ederek daha geniş spektrumdaki beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç göstermektedirler<sup>1,2</sup>. Bugüne kadar 29 tane farklı plazmid aracılı *ampC* geni tanımlanmış ve GenBank'da kaydedilmiştir.

Perez ve Hanson<sup>3</sup> tarafından altı çift primer setiyle gerçekleştirilen multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *ampC* beta-laktamaz genleri moleküler olarak saptanabilmektedir. Ancak moleküler yöntemler, sadece referans laboratuvarlarda uygulanabildiği için fenotipik olarak AmpC enzim üreten izolatların tanımlanmasına yönelik halen standart bir yöntem bulunmamaktadır<sup>4</sup>. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen sefoksitine dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* izolatlarında AmpC prevalansının araştırılması, AmpC enziminin fenotipik tespit yöntemlerinin karşılaştırılarak en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Haziran 2009-Eylül 2009 tarihleri arasında sefoksitine dirençli 42'si *E.coli*, sekizi *K.pneumoniae* olmak üzere toplam 50 izolat dahil edildi.

### GSBL ve AmpC Beta-Laktamazların Araştırılması

Bu amaçla boronik asit (BA)-klavulanik asit (CA) testi uygulandı. BA içeren disklerin hazırlanması için; 120 mg BA (benzenboronik asit veya 3-aminofenilboronik asit) 3 ml DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözüldükten sonra 3 ml distile su ilave edildi. Bu çözeltilerden 20 µl (400 µg) alınarak antibiyotik içeren (seftazidim, sefotaksim, sefoksitin) disklere emdirildi. Disklerin kurumması için oda ısısında 30 dakika bekletildi ve kullanılmaya kadar kapalı kaplar içerisinde +4°C'de saklandı. Test edilecek bakterinin 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu Mueller-Hinton agar (MHA)'a ekilip BA emdirilmiş antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra Bioanaliz firmasından temin edilen CA'dan 10 µl (10 µg) alınarak seftazidim, sefotaksim, sefoksitin, seftazidim + BA, sefotaksim + BA ve sefoksitin + BA içeren disklere damlatıldı.

Sefalosporin + CA + BA diski etrafındaki inhibisyon çapının, sefalosporin + CA diski etrafındaki inhibisyon çapından  $\geq 5$  mm olması durumunda, test edilen izolatta fenotipik olarak plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz olduğu kabul edildi. Sefalosporin + CA + BA diski etrafındaki inhibisyon çapının, sefalosporin + BA diski etrafındaki inhibisyon çapından  $\geq 5$  mm olması durumunda da, test edilen izolatta fenotipik olarak GSBL olduğu kabul edildi<sup>5</sup>.

### Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamazların Araştırılması

Bu amaçla, Black ve arkadaşlarının<sup>6</sup> uyguladığı AmpC disk testi (AmpC-DT) ile Coudron ve arkadaşlarının<sup>7</sup> tarif ettiği üç boyutlu test (3BT) modifiye edilerek (M3BT) aynı plakta eş zamanlı olarak uygulandı. M3BT'de enzim ekstraktı yerine 5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış yoğun bakteri süspansiyonu kullanıldı. Antibiyotiklere duyarlı bir *E.coli* klinik izolatu, eküvyon ile 9 cm'lik MHA yüzeyine yayıldıktan sonra her plağa 30 µg'lık sefoksitin diski yerleştirildi. Her bir sefoksitin diskinin iki tarafına bitişik olarak ikişer adet disk yerleştirildi. Bu disklerden biri boş, diğeri ise serum fizyolojik (SF) ile 1/1 oranında sulandırılmış Tris-EDTA (pH= 8) emdirilen disklerdi. Tris-EDTA emdirilmiş disklere 20'şer µl SF damlatıldıktan sonra kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinden birkaç tane alınarak disklerin yüzeyine sürüldü. Diğer boş disk üzerine 5 McFarland bulanıklığında

hazırlanmış bakteri süspansiyonundan damlatıldı. Bir gece 35°C'de inkübe edildikten sonra disklerin çevresinde halka şeklinde görülen üreme veya sefoksitinin inhibisyon zonunu kestiği noktada üremenin artarak inhibisyon zonunda meydana getirdiği bozulma (distorsiyon) AmpC beta-laktamaz açısından pozitif olarak değerlendirildi.

### AmpC Enzim Genlerinin Araştırılması

Bu amaçla Perez ve Hanson'un<sup>3</sup> geliştirdiği multipleks PCR yöntemi uygulandı. DNA ekstraksiyonu için, kanlı agarda üretilmiş olan izolattan tek koloni alınarak 5 ml triptik soy buyyona ekildi. 37°C'de 20 saat inkübe edildikten sonra, buradan 1.5 ml alınarak 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak 500 µl steril distile su eklendi. Hücrelerin parçalanarak DNA'nın ortaya çıkarılabilmesi için kaynatma yöntemi kullanıldı. Kaynatma işlemi 95°C'de 10 dakika gerçekleştirildikten sonra, hücresel artıkların uzaklaştırılması için 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst sıvı alınarak DNA amplifikasyonu yapılmak üzere -20°C'de saklandı.

PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin dizilimleri Tablo 1'de gösterildi. Kısaca; 50 µl toplam hacim içerisinde 10 µl PCR tampon, 0.2 mM dNTP karışımı, 1.25 ünite Taq DNA polimeraz, 3 µl DNA örneği, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM primer (MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, FOXMR, FOXMF, DHAMR, DHAMF, EBCMF, EBCMR) eklenerek hazırlandı.

Termal döngü cihazında uygulanan 94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyondan sonra, 25 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 64°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika uzama ve son döngüden sonra 72°C'de 7 dakika daha uzama işlemi uygulandı. PCR ürünleri 10 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak UV transilüminatör kullanılarak görüntülendi. %2 agaroz içeren jel 1X TAE (Tris-asetat EDTA) ile hazırlandı ve 1X TAE tampon içerisinde 90 V'de iki saat yürütüldü. Her bir primer için oluşan bantlar kaydedildi.

Tablo 1. Amplifikasyonda Kullanılan Primer Dizileri

Hedefler	Primer	5'-3' baz dizisi	Amplikon büyüklüğü (bp)
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 ile CMY-11 arası	MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520
LAT-1 ile LAT-4 arası, CMY-2 ile CMY-7 arası, BIL-1	CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462
DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405
ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346
MIR-1, ACT-1	EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CCG CTT CCA CTG CCG CTG CCA GTT	302
FOX-1 ile FOX-5b arası	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190

## BULGULAR

Çalışmamızda, sefoksitine dirençli 50 izolatın 25 (%50)'inde BA-CA testi pozitif bulunmuş; bunların 22 (%88)'inde PCR ile *ampC* genleri tespit edilmiştir (Tablo II).

PCR-AmpC pozitif 21 izolatın (PCR-AmpC pozitif çıkan bir izolatta AmpC-DT ve M3BT bakılmadı) 11 (%52.3)'inde AmpC-DT ile M3BT pozitif bulunurken, AmpC-DT ve M3BT negatif olan 10 (%45.4) izolatta ise PCR ve BA testi pozitif olarak bulunmuştur. Bir izolatta da BA ve AmpC-DT pozitif olduğu halde PCR negatif olarak saptanmıştır. BA testi pozitif iki izolatta ise hem AmpC-DT hem de PCR negatif bulunmuştur (Resim 1).

PCR-AmpC pozitif 22 izolatın hepsinde (%100) CIT grubu *ampC* enzim (CMY-2 ile CMY-7 arası, LAT-1 ile LAT-4 arası ve BIL-1 AmpC beta-laktamazların bulunduğu grup) geni saptanmıştır. Bunların 1 (%4.5)'inde CIT ile birlikte MOX (MOX-1, MOX-2, CMY-8 ile CMY-11 arası AmpC beta- laktamazların bulunduğu grup) ve 1 (%4.5)'inde CIT ile

**Tablo II.** BA-CA Testi ile AmpC Pozitif Bulunan İzolatlarda AmpC Disk Testi, M3BT, PCR ve GSBL Sonuçları

İzolatlar	AmpC-DT ve M3BT*	BA-CA**	PCR CIT	PCR MOX	PCR EBC	GSBL
<i>E.coli</i> 29	-	CAZ-BA-CA, FOX-BA-CA	+			-
<i>E.coli</i> 31	+	FOX-BA-CA	+			-
<i>E.coli</i> 38	-	CAZ-BA-CA, CTX-BA-CA	++			-
<i>E.coli</i> 39	+	CTX-BA-CA	++			+
<i>E.coli</i> 35	+	CTX-BA-CA, FOX-BA-CA	+			+
<i>E.coli</i> 36	-	CTX-BA-CA CAZ-BA-CA	+			+
<i>E.coli</i> 40	+	CAZ-BA-CA	++	+		+
<i>E.coli</i> 46	-	FOX-BA-CA	+			+
<i>E.coli</i> 41	+	CAZ-BA-CA	+			-
<i>E.coli</i> 45	-	CAZ-BA-CA, CTX-BA-CA	+++			+
<i>E.coli</i> 44	+	CTX-BA-CA, CAZ-BA-CA, FOX-BA-CA	+++			+
<i>E.coli</i> 50	+	CAZ-BA-CA, CTX-BA-CA	++			+
<i>E.coli</i> 51	+	CAZ-BA-CA, CTX-BA-CA, FOX-BA-CA	+++			-
<i>E.coli</i> 48	+	CAZ-BA-CA, CTX-BA-CA, FOX-BA-CA	+++			+

**Tablo II.** BA-CA Testi ile AmpC Pozitif Bulunan İzolatlarda AmpC Disk Testi, M3BT, PCR ve GSBL Sonuçları (devamı)

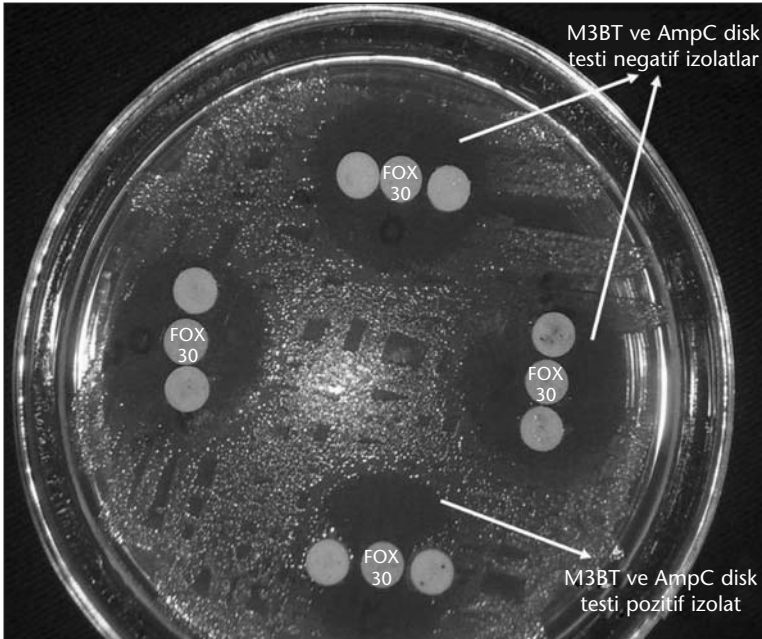
İzolatlar	AmpC-DT ve M3BT*	BA-CA**	PCR CIT	PCR MOX	PCR EBC	GSBL
<i>E.coli</i> 30***	-	CAZ-BA-CA, FOX-BA-CA	+			(+)
<i>E.coli</i> 32	-	CTX-BA-CA	+			+
<i>E.coli</i> 47	?	FOX-BA-CA	++			-
<i>E.coli</i> 34	-	CTX-BA-CA	++			+
<i>E.coli</i> 42	+	CTX-BA-CA	+			+
<i>E.coli</i> 43	+	CTX-BA-CA, CAZ-BA-CA, FOX-BA-CA	+			-
<i>K.pneumoniae</i> 53	-	CTX-BA-CA, FOX-BA-CA	+		+	+
<i>K.pneumoniae</i> 52	-	CAZ-BA-CA	+			-

\* M3BT ile AmpC disk test sonuçları aynı bulunmuştur.

\*\* BA ile pozitif sonuç veren antibiyotikler.

\*\*\* CLSI'ya göre GSBL negatif çıktığı halde BA eklenmesi ile zon farkı > 5 mm'den fazla olduğu için GSBL pozitif olarak değerlendirilen izolatlar.

AmpC-DT: AmpC disk testi; M3BT: Modifiye üç boyutlu test; BA-CA: Boronik asit-klavulanik asit testi.



**Resim 1.** AmpC disk testi ve M3BT.

birlikte EBC (MIR-1 ile ACT-1'in bulunduğu AmpC beta-laktamazlar) tipi *ampC* enzim geni tespit edilmiştir (Resim 2,3). MOX + CIT grubu *ampC* geni saptanan bu izolatta aynı zamanda GSBL varlığı da belirlenmiştir. DHA grubu ile FOX grubu *ampC* genlerine rastlanmamıştır. Bu çalışmada sefoksitine duyarlı izolatlar kullanılmadığı için ACC primeriyle *ampC* gen tayini yapılmamıştır.

GSBL tespiti için, CLSI'nın önerileri doğrultusunda yapılan kombine disk yönteminde AmpC enzimi üreten 22 izolatın 13 (%59)'ünde GSBL pozitifliği görülmüş; ancak kombine disk testine BA ilave edildikten sonra GSBL pozitif izolat sayısı 14 (%63.6)'e ulaşmıştır.

M3BT ve AmpC-DT pozitif bir izolatın sefoksitin inhibisyon zonunda oluşturduğu distorsiyon Resim 1'de gösterilmiştir. Disklerin çevresinde üreme veya distorsiyonun olma-



**Resim 2.** CIT primeri ile yapılan PCR sonuçları [Hat 1: Ec32(+); Hat 3: Ec30 (+); Hat 5: Ec42 (+); Hat 6: Ec46 (+); Hat 8: Negatif kontrol; Hat 9: Ec 40 (++)]; Hat 11: Ec36 (+); Hat 12: Ec45 (+++); Hat 14: Ec48 (+++); Hat 16: Ec44 (+++); Hat 19: Ec35 (+); Hat 20: Ec36 (+)]. Ec: E.coli.



**Resim 3.** CIT primeri ile yapılan PCR sonuçları [Hat 2: Ec31 (+); Hat 3: Ec29 (+); Hat 4: Ec39 (++)]; Hat 10: Ec38 (++)]; Hat 12: Ec43 (+); Hat 13: Ec34 (++)]; Hat 15: Negatif kontrol; Hat 18: Ec50 (++)]; Hat 19: Ec51 (+++)]. Ec: E.coli.

ması negatif olarak kabul edilmiştir. Bazı izolatlarda disk çevresinde sadece halka şeklinde üreme görülmüştür. PCR ile AmpC pozitif çıkan bu izolatlar da AmpC-DT pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 1).

*E.coli* suşlarının bazılarında [Ec45 (+++), Ec48 (+++), Ec44 (+++), Ec40 (++) , Ec34, Ec39 (++) , Ec38 (++) , Ec50 (++) , Ec51 (+++)] 2 veya 3 farklı baz hacminde homolog bandlar saptanmış; ayrıca AmpC enzim miktarına bağlı olarak bazı suşların (Ec44, Ec51, Ec31) diğerlerine göre daha kalın bandlar oluşturduğu görülmüştür (Resim 2,3).

## TARTIŞMA

Araştırmalara göre GSBL tarama testi pozitif çıkan ancak CLSI'nin doğrulama testine göre GSBL negatif bulunan izolatların oranı son zamanlarda %75'lere kadar ulaşmıştır. Bu tür izolatlarda sonradan yapılan çalışmalarla plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz varlığı gösterilmiştir<sup>8</sup>. AmpC beta-laktamazlar tıpkı GSBL'de olduğu gibi rutin duyarlılık testinde seftazidim ve sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere yanlı olarak duyarlı görünmekte ve bunlarla yapılan tedaviye bağlı olarak hastalarda klinik başarısızlık ortaya çıkmaktadır<sup>4,9</sup>. Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar GSBL'den daha az yaygın olmalarına rağmen onlardan daha geniş spektrumda beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermektedirler<sup>10</sup>. Tenover ve arkadaşlarının<sup>11</sup> çalışmasında, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerden en az birine dirençli 80 izolatta (*K.pneumoniae*, *E.coli* ve *Proteus mirabilis*) AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmış; BA testi pozitif çıkan 31 izolatın 18 (%58)'inde PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. Ülkemizde Ak<sup>12</sup> tarafından yapılan çalışmada, sadece BA kullanılarak plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz araştırılmış ve 159 *E.coli* izolatının %32.7'sinde, 55 *Klebsiella* spp. suşunun ise %18.1'inde pozitiflik saptanmıştır. Ancak GSBL'nin etkisini ortadan kaldırmak için CA ilave edildiğinde *E.coli*'de AmpC beta-laktamaz pozitif izolat oranı %9.4'e, *Klebsiella* spp.'de ise %14.5'e düşmüştür<sup>12</sup>. Bu çalışmada BA-CA ve 3BT ile AmpC pozitif olarak saptanan 58 izolatın sadece yedi (%12)'sinde PCR ile AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir<sup>12</sup>.

Güney Kore'de yapılan bir çalışmada, sefoksitine dirençli (SR) 100 izolatta (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *Salmonella* spp.) GSBL ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tayininde fenotipik test olarak BA-CA disk testi uygulanmış; 41 SR izolatın hepsinde BA-CA testiyle pozitiflik saptanmış; bunların içinde BA-CA pozitif 33 SR *K.pneumoniae* izolatının hepsinde PCR ile AmpC beta-laktamaz pozitif (CIT ve DHA grubu) bulunmuştur<sup>13</sup>. Çalışmamızda, toplam 50 SR izolatın (sekiz *K.pneumoniae*, 42 *E.coli*) 25 (%50)'inde BA-CA inhibisyon testiyle pozitif sonuç elde edilmiş; bunların 22 (%88)'sinde PCR ile AmpC enzim genleri saptanmıştır. Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi sadece BA ile yapılan inhibisyon testinde GSBL'ye bağlı olarak yanlı AmpC beta-laktamaz pozitif sonuç alınabildiği gibi sadece CA kullanıldığında<sup>8</sup> AmpC beta-laktamazlara ve Sınıf A karbapenemazlara<sup>14</sup> bağlı olarak yanlı GSBL pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle plazmid aracılı AmpC ve GSBL araştırmasında BA-CA ikilisinin kullanılması uygundur. Çalışmamızda, BA-CA testi pozitif çıkan 53 SR izolatın 10'unda ve sefoksitine duyarlı 13 izolatta PCR ile AmpC negatif olarak bulunmuştur. Kullandığımız PCR kitiyle 29 farklı *ampC* gen bölgesi araştırılabilmektedir. Ancak muhtemel AmpC progenitörü olabilecek 59 *ampC* geninin



GenBank'da depolandığı bildirilmiştir<sup>15</sup>. BA-CA testi pozitif olduğu halde AmpC tespit edilemeyen izolatlarda bu tip plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar olabileceği düşünülmektedir.

Plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tiplerinin dünyadaki dağılımının bölgeden bölgeye farklılık gösterdiği görülmektedir. Örneğin; Çin'de yapılan bir çalışmada, AmpC pozitif bulunan izolatların hepsinde DHA-1 enzimi tespit edilmiştir<sup>16</sup>. ABD'de 2001-2002 yılları arasında yapılan çalışmada da, AmpC pozitif 28 *K.pneumoniae* izolatının %92.8'inde FOX-5 enzimi bulunmuştur<sup>17</sup>. Ülkemizde ise bu konuda yapılmış çalışmalar kısıtlıdır. Bal ve arkadaşları<sup>18</sup>, transplantasyon hastalarından izole edilen ve çoklu direnç gösteren *K.pneumoniae* suşlarında CMY-2 varlığını izoelektrik odaklama testiyle göstermişlerdir. Akdeniz Üniversitesinde yapılan bir çalışmada, sefoksitine azalmış duyarlılık gösteren veya dirençli bulunan *E.coli* izolatlarının %7.4 (2/27)'ünde CMY-2 benzeri enzim saptanmıştır<sup>19</sup>. Bizim çalışmamızda, PCR ile AmpC enzim genleri pozitif bulunan 22 izolatın tümünde (%100) CIT grubu tespit edilmiş, birer izolatta olmak üzere (%4.5) ise CIT + MOX ve CIT + EBC (%4.5) birlikteliği izlenmiştir.

Bazı plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tipleri *E.coli*'de daha sık bulunurken bazıları *Klebsiella* spp.'de daha sık bulunmaktadır. Örneğin; Kore'de *Klebsiella* spp. ve *E.coli* suşlarında yapılan çalışmada, DHA-1 enzimi *E.coli*'de %8.6, *Klebsiella* spp.'de %76.2 oranında saptanırken, CMY-2 enzimi *E.coli*'de %32.7, *Klebsiella* spp.'de %0.8 oranında tespit edilmiştir<sup>20</sup>. Çalışmamızda, *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşlarının tamamında CIT grubu enzim bulunurken bir *K.pneumoniae* suşunda CIT grubuna ilaveten MOX, bir *E.coli* suşunda CIT grubuna ilaveten EBC saptanmış olup, bu fark bizim çalışmamızda *K.pneumoniae* izolat sayısının azlığından kaynaklanmış olabilir.

AmpC beta-laktamaz üreten izolatlardaki GSBL varlığına bakılacak olursa, Çin'de 2008 yılında yapılan bir çalışmada, AmpC üreten 54 izolatın 27 (%68.5)'sinde GSBL testi pozitif olarak bulunmuştur<sup>16</sup>. Aynı çalışmada, her bir izolatta farklı hacimlerde bandların görülmesinin, *ampC* genlerinin duplikasyonu ile ortaya çıkan başka homolog genlerin varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir<sup>16</sup>. Çalışmamızda, AmpC üreten 22 izolatın 14 (%63.6)'ünde GSBL testiyle pozitif sonuç alınmış; CIT grubu primerleriyle hibridize olan farklı hacimlerde bandlar görülmüş ve bu izolatlar pozitif AmpC olarak değerlendirilmiştir. Farklı hacimlerdeki bandların sadece CIT primerinde görülmesi bu tip AmpC enzim varlığının oldukça yaygın olduğunu göstermektedir.

AmpC disk testiyle ilgili çalışmalara bakıldığında, Ingram ve arkadaşları<sup>21</sup> tarafından 246 enterik bakteri izolatı üzerinde AmpC beta-laktamaz tespitinde uygulanan tarama ve doğrulama testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmıştır. Doğrulama yöntemi olarak inhibitör temelli testler, AmpC E test, TRIS-EDTA ve MAST ID D6SC disk testi, kromojenik testler, 3BT ve multipleks PCR kullanılmıştır. Çoğunlukla CMY, DHA ve EBC enzimlerinin tespit edildiği 74 izolatta AmpC beta-laktamaz saptanmıştır. Tarama testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %47-99 ve %45-95; doğrulama testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri ise sırasıyla %19-97 ve %88-100 arasında bulunmuştur<sup>21</sup>. PCR ve 3BT referans olarak alındığında doğrulama testleri arasında duyarlılığı (> %90) ve özgüllüğü

(> %90) en yüksek testin TRIS-EDTA ve MAST ID D6SC disk testinin olduğu belirtilmiştir<sup>21</sup>. Çalışmamızda PCR testi referans olarak değerlendirildiğinde, AmpC disk testi ile M3BT'nin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça farklı oranlarda saptanmış ve bu değerler sırasıyla; %52.3 ve %33.3 olarak bulunmuştur. AmpC disk testi ve M3BT'nin yorum açısından inhibitör temelli testlerden daha komplike oldukları gözlenmiştir.

GSBL pozitif ve negatif izolatlarda AmpC prevalansına bakılacak olursa; 2003 yılında Kore'de 16 hastaneden toplanan 238 (*E.coli*, *K.pneumoniae*) SR izolatta PCR ile dizi analizi yapılarak AmpC beta-laktamaz ve GSBL varlığı araştırılmış; GSBL pozitif ve negatif hastalarda AmpC prevalansının eşit olduğu bildirilmiştir<sup>20</sup>. Çalışmamızda da, sefoksitine dirençli GSBL pozitif ve negatif izolatlarda saptanan AmpC beta-laktamaz pozitiflik oranları benzer (sırasıyla; %44.4 ve %45) bulunmuştur.

*K.pneumoniae* karbapenemaz (KPC) enzimi bulunduran *K.pneumoniae* izolatlarında bazı porin proteinlerinin düşük düzeyde sentezlendiği saptanmıştır. Bu enzimler porin kaybıyla birlikte görüldüğü için antibiyogramda sefoksitine dirençli görülürler, oysa transkonjugantlarında sefoksitine duyarlıdır<sup>14</sup>. Karbapenemazların tıpkı AmpC enzimleri gibi BA ile inhibisyon özelliğinden yararlanılarak karbapenemaz üreten izolatlarda GSBL araştırılan çalışmalar da mevcuttur<sup>22</sup>. GSBL tayininde BA'nın sadece AmpC enzimlerini değil aynı zamanda karbapenemazları da inhibe etmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamasında, beta-laktamaz tür tayini için önerilebilecek bir algoritma; antibiyogramla eş zamanlı olarak sefoksitin ve amoksisilin-klavulanik diski ile bir ön taramayı takiben, bu antibiyotiklere dirençli suşlar için CLSI'nın önerdiği GSBL doğrulama testine BA ekleyerek AmpC ve GSBL bakılmasıdır. Böylelikle GSBL veya AmpC açısından yanlış negatif sonucun verilmesi, buna bağlı olarak üçüncü kuşak sefalosporinlere yanlış olarak duyarlı olduğunun bildirilmesiyle tedaviye yönelik hatalar önenebilir.

## KAYNAKLAR

1. Phillipon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 1-11.
2. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(3): 264-70.
3. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2153-62.
4. Pai H, Kang CI, Byeon JH, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(10): 3720-8.
5. Song W, Jeong SH, Kim JS. 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.
6. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disc test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3110-3.
7. 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.

8. Robberts FJ, Kohner PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum beta-lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. J Clin Microbiol 2009; 47(2): 358-61.
9. Black J, Thomson KS, Buynak JD, et al. Evaluation of beta-lactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in well-characterized clinical strains of *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 4168-71.
10. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2): 533-7.
11. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol 2009; 47(2): 294-9.
12. Ak S. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2008, Ankara.
13. Park SD, Uh Y, Lee G, et al. Prevalence and resistance patterns of extended spectrum and AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella* serovar Stanley in Korean tertiary hospital. APMIS 2010; 118(10): 801-8.
14. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended spectrum, AmpC and carbapenem hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 1971-6.
15. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22(1): 161-82.
16. Li Y, Li Q, Du Y, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2 type AmpC beta-lactamase resistance in China. J Clin Microbiol 2008; 46(4): 1317-21.
17. Moland ES, Black JA, Hossain A, et al. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative isolates collected in the United States from 2001 to 2002. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3318-24.
18. Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE ve ark. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik sefamiaz CMY-2. İnfeksiyon Dergisi 1995; 9(1): 67-9.
19. Demirbakan H, Midilli K, Öğünç D ve ark. Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı saptanan *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzim tiplerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4): 545-51.
20. Lee K, Lee M, Shin J, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. Microb Drug Resist 2006; 12(1): 44-9.
21. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, et al. Comparison of methods for AmpC beta-lactamase detection in *Enterobacteriaceae*. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 6): 715-21.
22. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *K.pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(4): 1151-61.