

Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Kan Kültürü İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması

Investigation of Plasmid Mediated AmpC Beta-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Blood Cultures

Ayşe Nur SARI, Meral BİÇMEN, Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

* Bu çalışmanın bir bölümü, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (3-7 Kasım 2012, Aydın)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 09.07.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.09.2013

ÖZET

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde, yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmid kökenli AmpC (pAmpC) beta-laktamaz sıklığının ve tiplerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2007-2012 yılları arasında izole edilen, sefotaksim ve/veya seftazidime dirençli, imipeneme duyarlı 184 (%70.5)'ü *E.coli* ve 77 (%29.5)'si *K.pneumoniae* olmak üzere toplam 261 izolat dahil edilmiştir. Bu izolatlarda AmpC enzim göstergesi olarak sefoksitin duyarlılığı araştırılmıştır. Sefoksitine dirençli bulunan 57 (%21.8) izolatta (32 *E.coli*, 25 *K.pneumoniae*) multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *pampC* varlığı araştırılmıştır. Ayrıca, sefoksitini hidrolize etmeyen bir pAmpC olan ACC varlığını araştırmak üzere sefoksitine duyarlı izolatlar her yıla ait 10'ar adet olacak şekilde rastgele seçilerek multipleks PCR çalışmasına alınmıştır. PCR ile saptanan *pampC* genleri, dizi analizi ile doğrulanmıştır. Çalışmada ayrıca, *pampC* geni taşıyan izolatlarda plazmid analizi ve klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla makrorestriksiyon analizi yapılmıştır. Sefoksitine dirençli *E.coli* izolatlarının %9.4 (3/32)'ünde ve *K.pneumoniae* izolatlarının %8 (2/25)'inde pAmpC varlığı saptanmıştır. Bu enzim, 2007 ve 2008 yıllarında hiçbir izolatta saptanmazken, çalışma izolatları içinde enzimin görülme sıklığı 2009 yılında %1.6'ya (bir *K.pneumoniae* izolatına ait ACT-1 enzimi), 2011 yılında %4.8'e (bir *K.pneumoniae* izolatına ait ACT-1 enzimi), 2012 yılında ise %6.4'e (3 *E.coli* izolatına ait CMY-2 enzimi) yükselmiştir. Bu enzimlerin, *K.pneumoniae* izolatlarında 81 kb büyüklüğündeki bir plazmid ile, *E.coli* izolatlarında ise 9 kb büyüklüğündeki bir plazmid ile taşındığı gösterilmiştir. Makrorestriksiyon analizi ile, CMY-2 enzimi üreten iki *E.coli* izolatının aynı PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) paternine sahip ol-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 4503, **E-posta (E-mail):** zeynep.gulay@deu.edu.tr

duğu görülmüştür. Bu iki izolat aynı suş olarak değerlendirmeye alındığında, 2007-2012 yıllarını kapsayan süre zarfında kurumumuzda toplam AmpC prevalansı düşük (4/261; %1.5) bulunmuştur. Ancak, 2011 ve 2012 yıllarında artma eğilimi görülmesi, enzim prevalansının izlenmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından bir uyarı niteliğindedir. Ayrıca, literatür incelemesine göre, *K.pneumoniae* izolatlarında ACT-1 enzimi ülkemizde ilk kez bu çalışmada saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *pAmpC beta-laktamaz; Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae; CMY-2; ACT-1.*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the prevalence and types of plasmid-mediated AmpC (pAmpC) beta-lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood cultures of hospitalized patients in Dokuz Eylül University Hospital between 2007 and 2012. A total of 261 isolates which consisted of 184 *E.coli* (70.5%) and 77 *K.pneumoniae* (29.5%) were included in the study. All isolates were resistant to cefotaxime and/or ceftazidime but susceptible to imipenem. Cefoxitin resistance was investigated as an indicator of AmpC type enzymes. A total of 57 (21.8%) isolates which were cefoxitin-resistant (32 *E.coli*, 25 *K.pneumoniae*), were screened for *pampC* genes by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay. Additionally, 10 of each cefoxitin susceptible isolates per year were chosen randomly and screened by the same PCR assay to detect the presence of ACC enzymes, which can not hydrolyze cefoxitin. Positive PCR results were confirmed by sequence analysis. Plasmid analysis and macrorestriction analysis were performed for *pampC*-positive isolates. The presence of pAmpC enzymes has been shown in 9.4% (3/32) of cefoxitin-resistant *E.coli*, and 8% (2/25) of cefoxitin-resistant *K.pneumoniae* strains. It was noted that there were no strains producing this enzyme isolated in 2007 and 2008, however the prevalence of pAmpC was detected as 1.6% in 2009 (one ACT-1 producing *K.pneumoniae*), increasing to 4.8% in 2011 (one ACT-1 producing *K.pneumoniae*) and 6.4% in 2012 (three CMY-2 producing *E.coli*). These enzymes were found to be carried on 81 kb size plasmids in *K.pneumoniae* isolates and on a 9 kb size plasmid in *E.coli* isolates. Macrorestriction analysis indicated that two of the three CMY-2 producing *E.coli* had the same PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) pattern. If these two strains are considered as identical, it can be concluded that the prevalence of pAmpC was low in the strains isolated between 2007-2012 (4/261; 1.5%) in our institution. On the other hand, the increasing prevalence of pAmpC in 2011 and 2012 should be considered as a warning for the implementation of infection control measures and monitorization of the prevalence in order to prevent the dissemination of pAmpC. As far as the current literature is concerned, this is the first study that demonstrated the presence of the ACT-1 enzyme in *K.pneumoniae* isolates in Turkey.

Key words: *pAmpC beta-lactamase; Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae; CMY-2, ACT-1.*

GİRİŞ

AmpC beta-laktamazlar, sefalosporinleri parçalayan ve son sınıflandırmalara göre sınıf C (Grup 1) kategorisinde yer alan beta-laktamazlardır¹. Yüksek düzeyde AmpC tipi beta-laktamaz üreten organizmalar, genellikle dördüncü kuşak sefalosporinler ile karbapenemler dışındaki beta-laktam ajanlara, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerine ve monobaktamlara dirençlidir. Bu direnç profili, bu organizmalara karşı kullanılabilecek etkin tedavi seçeneklerini ciddi ölçüde kısıtlamaktadır^{2,3}. Gram-negatif mikroorganizmalarda AmpC tipi enzimlerin yüksek miktarlarda üretimi, kromozomal *ampC* geninin aşırı ekspresyonu ya da plazmid ile taşınan *ampC* genlerinin kazanılmasıyla olmaktadır^{3,4}.

Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar (pAmpC), horizontal geçiş ile türler arasında yayılabilmeleri, porin kaybı gibi başka bir mekanizma ile birleştiklerinde karbapenemlere karşı direnç oluşturabilmeleri ve kromozomal *ampC* geni olmayan *K.pneumoniae*, *Salmonella* gibi klinik açıdan önemli türlerde bulunmaları nedeniyle önem taşımaktadır⁴⁻⁷. Bunun yanı sıra, son yıllarda ABD’de yapılan çalışmalarda kromozomal *ampC* geninin yüksek düzey ekspresyonunun nadir olarak saptandığı *E.coli* izolatlarında, CTX-M üretiminin sonra en yaygın sefalosporin direnç mekanizmasının pAmpC enzimler olduğu gösterilmiştir^{8,9}.

“Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” önerileri gibi belirli bir tanımlama kriterinin olmaması, bu direnç mekanizmasına sahip izolatların saptanmasında problem teşkil etmektedir. Bir diğer sorun ise, porin kaybı ve/veya yüksek düzeyde kromozomal AmpC üretiminin benzer fenotiplere yol açabilmesidir. Bu birleşik mekanizmalar özellikle *E.coli*’de görülmektedir^{10,11}. pAmpC üreten izolatların belirlenmesinde, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim, sefotaksim) ve sefoksitin direncine sahip izolatların seçilmesi önerilen bir yöntemdir¹². Ancak fenotipik doğrulama yöntemleri de bulunmasına rağmen, *pampC* genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması ve dizi analizi ile doğrulanması altın standart olarak kabul edilmektedir¹³.

Saptama güçlükleri nedeniyle pAmpC prevalansı ve tiplerine yönelik ülkemizde yapılmış çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Oysa ki, bu beta-laktamazlar enfeksiyon kontrolü açısından genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ile eşit öneme sahiptir. Kurumumuzda ilk kez yapılmış olan bu çalışmada, 2007-2012 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastalardan elde edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* kan kültürü izolatlarında pAmpC sıklığı ve tipleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya alınan izolatlar Ocak 2007-Mayıs 2012 tarihleri arasında kan kültürlerinde üreyen 863 *E.coli* ve 598 *K.pneumoniae* arasından seçildi. pAmpC tipi beta-laktamaz üreten izolatlarda üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı oluşan direnç veya duyarlılıkta azalma görülmesi nedeniyle, EUCAST önerilerine¹⁴ de uyularak, çalışmaya sefotaksim ve/veya seftazidime dirençli izolatlar dahil edildi. Hastanemizdeki sık görülen karbapenemazlara bağlı sefalosporin direncini elemek amacıyla, imipeneme dirençli izolatlar çalışmaya alınmadı. Dolayısıyla bu kriterlere uyan 184 (%70.5)’ü *E.coli* ve 77 (%29.5)’si *K.pneumoniae* olmak üzere toplam 261 izolat çalışmaya dahil edildi. Tüm izolatlar yatan hastalardan üretilmiş olup, tek hastadan tek izolat olacak şekilde seçildi.

Sefoksitin Direncinin Saptanması

İzolatların sefoksitin duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı¹⁵. Zon çapı 18 mm’den küçük olan izolatlar, *pampC* gen varlığını araştırmak üzere seçildi. Ancak bazı ACC enzimlerinin sefoksitini hidrolize edememeleri ve izolatların sefoksitine duyarlı olmaları nedeniyle¹⁶; her yıla ait 10’ar adet (toplam 60) sefotaksim ve/veya seftazidime dirençli ancak sefoksitine duyarlı izolat, rastgele seçilerek multipleks PCR çalışmasına alındı.

Plazmid Aracılı *ampC* Gen Ailelerinin Araştırılması

Plazmid aracılı *ampC* genlerini araştırmak üzere daha önce tanımlanmış ve *pampC* gen ailelerinden altısını (MOX, CIT, DHA, ACC, EBC ve FOX) belirleyebilen bir multipleks PCR yöntemi uygulandı¹⁷. Kullanılan primerler, hedef gen bölgeleri ve beklenen bant büyüklükleri Tablo 1’de gösterildi [CIT primeri, LAT1-4/CMY/BIL-1 (CMY-2 ile aynıdır) enzimlerini; EBC ise, MIR-1 ve ACT enzimlerini hedeflemektedir].

DNA ekstraksiyonu için, sefoksitine dirençli izolatlar, kanlı agarda 37°C’de 20 saat inkübe edildikten sonra, 1-2 bakteri kolonisi 250 µl steril saf suda homojenize edildi. 100°C’de 10 dakika kaynatılan hücre süspansiyonu, 10.000 rpm’de beş dakika santrifüj edilerek 2 µl süpernatant kalıp DNA olarak kullanıldı.

PCR çalışmasında CMY-2 (CIT gen ailesinden) geni taşıdığı bilinen bir *E.coli* kontrol izolatu ve ACT-1 geni taşıdığı bilinen bir *K.pneumoniae* klinik izolatu, pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Multipleks PCR çalışması sonucunda pozitif bulunan gen amplifikasyon ürünleri, PCR çalışmasının doğrulanması ve *pampC* geninin belirlenmesi amacıyla dizi analizine gönderildi. MacroGen Inc (Kore) firmasının belirlenen diziler, Mega 5.02 ve BLAST analiz yazılımları kullanılarak yorumlandı.

pampC Taşıyan Plazmidlerin Saptanması

AmpC pozitif suşlardan plazmid eldesi, alkali lizis yöntemiyle yapıldı¹⁸. Elde edilen plazmidler %0.7 agaroz jelde *Hind* III lambda DNA belirteciyle birlikte yürütüldü. Görülen tüm plazmidler jelden kesilerek, GenElute Gel Extraction Kit (Sigma; Missouri, USA) ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu şekilde elde edilen plazmid DNA’sı kalıp olarak kullanılarak özgül primerler ile AmpC PCR çalışıldı.

Tablo 1. *pampC* Genlerinin Saptanmasında Kullanılan Primerler ve Beklenen Bant Büyüklükleri

Primer	Dizi	Hedef AmpC	Bant büyüklüğü*
MOXM-F MOXM-R	5-GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT-3 5-CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C-3	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8-11	520
CITM-F CITM-R	5'-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3 5'-TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3'	LAT-1, LAT-4, CMY-2, CMY-7, BIL-1	462
DHAM-F DHAM-R	5'-AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T-3' 5'-CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC-3'	DHA-1, DHA-2	405
ACCM-F ACCM-R	5'-AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA-3' 5'-TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC-3'	ACC	346
EBCM-F EBCM-R	5'-TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG-3' 5'-CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT-3'	MIR-1T, ACT-1	302
FOXM-F FOXM-R	5'-AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G-3' 5'-CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG-3'	FOX-1, FOX-5b	190

* Baz çifti (bp).

pAmpC Üreten İzolatlarda Klonal İlişkinin Belirlenmesi

pAmpC üreten izolatlar arasındaki klonal ilişki, XbaI enzimi ile makrorestriksiyon analizi yapılarak araştırıldı. Her iki tür için de PulseNet'in önerdiği değişimli alan jel elektroforezi (Pulsed field gel electrophoresis; PFGE) protokolü uygulandı¹⁹.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 184 *E.coli* izolatından 32 (%17.4)'si ve 77 *K.pneumoniae* izolatından 25 (%32.5)'i sefoksitine dirençli bulunmuştur. Yıllara göre çalışılan izolat sayısı, sefoksitin direnç oranları ve pAmpC pozitif izolat sayıları Tablo II'de gösterilmiştir.

PCR Sonuçları

Sefoksitine dirençli 57 izolata uygulanan PCR çalışması sonucunda 2 *K.pneumoniae* izolatında MIR-1T/ACT-1 (EBC enzimleri) gen bölgelerini hedefleyen 302 bç büyüklüğündeki gen bölgesi ve 3 *E.coli* izolatında LAT-1-LAT-4/CMY-2-CMY-7/BIL-1 (CIT enzimleri) gen bölgelerini hedefleyen 462 bç büyüklüğündeki gen bölgesi pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Sefoksitine dirençli izolatların %8.8 (5/57)'i *pampC* genine sahiptir. Bu izolatlardan üçü *E.coli* (sefoksitine dirençli tüm *E.coli* izolatlarının %9.4'ü), ikisi ise *K.pneumoniae* (sefoksitine dirençli tüm *K.pneumoniae* izolatlarının %8'i) suşudur.

ACC enzim varlığını araştırmak üzere sefoksitine duyarlı 60 izolata uygulanan PCR çalışması sonucunda ise pozitif sonuç elde edilmemiştir.

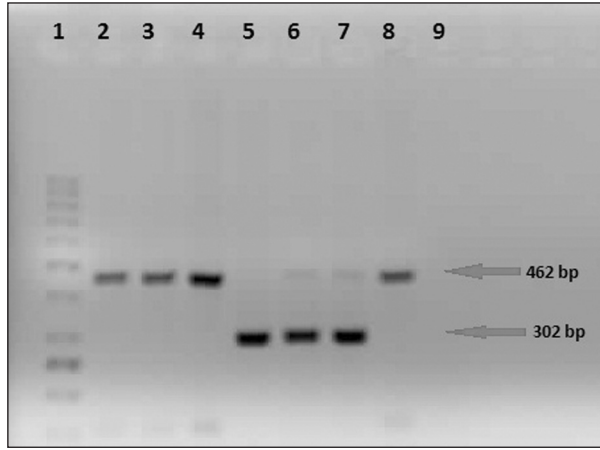
Tablo II. Sefoksitine (FOX) Dirençli ve pAmpC Saptanan İzolatların Yıllara Göre Dağılımı

Yıl	<i>E.coli</i>			<i>K.pneumoniae</i>			Prevalans	
	İzolat sayısı	FOX direnci n (%)	pAmpC (+) izolat	İzolat sayısı	FOX direnci n (%)	pAmpC (+) izolat	P-1*	P-2**
2007	37	6 (16.2)	0	11	6 (54.5)	0	0 (0/12)	0 (0/48)
2008	39	2 (5.1)	0	15	5 (33.3)	0	0 (0/7)	0 (0/54)
2009	44	12 (27.3)	0	19	6 (31.6)	1 (ACT-1)	%5.6 (1/18)	1.6 (1/63)
2010	21	5 (23.8)	0	7	3 (42.9)	0	0 (0/8)	0 (0/28)
2011	15	2 (13.3)	0	6	4 (66.7)	1 (ACT-1)	%16.7 (1/6)	%4.8 (1/21)
2012	28	5 (17.9)	3 (CMY-2)	19	1 (5.3)	0	%50 (3/6)	%6.4 (3/47)
Toplam	184	32 (17.4)	3	77	25 (32.5)	2	%8.8 (5/57)	%1.9 (5/261)***

* P-1: O yıla ait sefoksitine dirençli *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında pAmpC görülme sıklığını göstermektedir.

** P-2: O yıla ait tüm çalışma izolatları arasında pAmpC görülme sıklığını göstermektedir.

*** PFGE sonuçlarına göre %1.5 (4 suş/261).



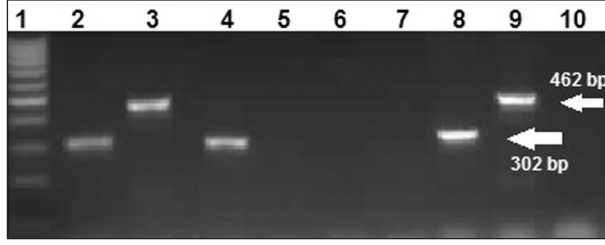
Şekil 1. *pampC* geni taşıyan izolatlara ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Hat 1: 50 bç DNA belirteci; Hat 2-4: LAT-1-LAT-4/CMY-2-CMY-7/BIL-1 gen bölgesi pozitif *E.coli* izolatları; Hat 5-6: MIR-1T/ACT-1 gen bölgesi pozitif *K.pneumoniae* izolatları; Hat 7: ACT-1 pozitif kontrol; Hat 8: CMY-2 pozitif kontrol; Hat 9: Negatif kontrol).

Plazmid aracılı *ampC* genine sahip olduğu belirlenen izolatlara yapılan dizi analizi sonucunda üç *E.coli* izolatının da CMY-2 enzimini ürettiği görülmüştür. *K.pneumoniae* izolatlarına ait enzim tipi ise ACT-1 olarak tanımlanmıştır. Bu bulgulara göre; hastanemizdeki altı yıllık süre içinde üretilen sefoksitine dirençli *E.coli* ve *K.pneumoniae* kan izolatları arasında CMY-2 enzimi saptanma oranı %5.3 (3/57), ACT-1 enzimi saptanma oranı ise %3.5 (2/57) olarak hesaplanmıştır.

Yıllara göre dağılıma bakıldığında; 2007, 2008 ve 2010 yıllarında izole edilen sefoksitine dirençli izolatların hiçbirinde pAmpC beta-laktamaz geni bulunamamıştır. İlk olarak 2009 yılında izole edilen bir *K.pneumoniae* izolatında ACT-1 geni bulunmuştur. Bu yıla ait sefoksitine dirençli çalışma izolatları içindeki enzim görülme sıklığı %5.6 olarak hesaplanmıştır. 2011 yılında ise bir *K.pneumoniae* izolatının ACT-1 enzimi ürettiği görülmüştür. Bu durumda sefoksitine dirençli çalışma izolatları arasında *pAmpC* enzim pozitifliği %16.7'ye yükselmiştir. 2012 yılı bulgularına göre ise üç *E.coli* izolatında *pampC* (CMY-2) geni bulunmuştur. Bu yıla ait pozitiflik oranı ise sefoksitine dirençli çalışma izolatları içinde %50 (3/5) olarak hesaplanmıştır.

Plazmid Analizi Sonuçları

pampC saptanan izolatlardan yapılan plazmid ekstraksiyonu sonucunda ACT-1 pozitif *K.pneumoniae* izolatlarının her ikisinde de 81 kb ve 8 kb büyüklüğünde plazmidler elde edilmiştir. 2009 yılında izole edilen *K.pneumoniae* izolatında ayrıca 34 kb büyüklüğünde ek bir plazmid daha görüntülenmiştir. CMY-2 pozitif *E.coli* izolatlarında ise 9 kb büyüklüğünde birer plazmid saptanmıştır. Elde edilen plazmidler ile yapılan PCR sonucunda; *K.pneumoniae* izolatlarında ACT-1 geninin 81 kb büyüklüğündeki plazmid ile, *E.coli* izolatlarında ise CMY-2'nin 9 kb büyüklüğündeki plazmid ile taşındığı gösterilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Elde edilen plazmidler ile yapılan multipleks PCR çalışmasına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Hat 1: 100 bp DNA belirteci; Hat 2: ACT-1 pozitif *K.pneumoniae* izolatına ait 81 kb'lık plazmid; Hat 3: CMY-2 pozitif *E.coli* izolatına ait 9.0 kb'lık plazmid; Hat 4: ACT-1 pozitif diğer *K.pneumoniae* izolatına ait 81 kb'lık plazmid; Hat 5-7: *K.pneumoniae* izolatlarından elde edilen sırasıyla 8 kb, 8 kb ve 34 kb büyüklüğündeki plazmidler; Hat 8: ACT-1 geni taşıdığı bilinen pozitif kontrol izolatı; Hat 9: CMY-2 geni taşıdığı bilinen pozitif kontrol izolatı; Hat 10: Negatif kontrol).



Şekil 3. Plazmid kökenli AmpC enzimi üreten izolatlara ait PFGE görüntüsü.

Plazmid Aracılı AmpC Enzimi Üreten İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkinin İncelenmesi

Plazmid aracılı AmpC enzimi üreten beş izolata ait PFGE çalışması sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 3'te görülmektedir. PFGE bulgularına göre yakın tarihlerde hastanemizde yatmış iki hastadan izole edilen ve CMY-2 enzimi üreten iki *E.coli* izolatının aynı PFGE paternine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu patern, üçüncü *E.coli* izolatından farklıdır. Plazmid aracılı AmpC enzimi üreten *K.pneumoniae* izolatlarına ait paternler de birbirinden farklı bulunmuştur. pAmpC pozitif 2 *E.coli* izolatı aynı suş olduğu için, çalışmaya alınan sefoksitine dirençli izolatlar arasındaki CMY-2 saptanma oranı %3.5'e (2/57) düşmektedir.

TARTIŞMA

Plazmid kökenli AmpC beta-laktamazlar GSBL'lere göre daha az yaygın olmakla beraber, daha geniş bir antibiyotik direnç profili sergilemeleri açısından önemlidir. Şimdiye kadar bildirilmiş dokuz pAmpC enzim ailesi (CMY, ACC, ACT, CFE-1, DHA, FOX, LAT-1, MIR, MOX) ve bu aileler içerisinde 150'den fazla enzim bulunmaktadır²⁰. Bu beta-laktamazları üreten izolatların hastanemizdeki sıklığının ve enzim tiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmamızda, *E.coli* izolatlarında AmpC beta-laktamaz ailesinden CMY en-

zim ailesine ait CMY-2 gen bölgesi ve *K.pneumoniae* izolatlarında da ACT enzim ailesine ait ACT-1 gen bölgesi belirlenmiştir. CMY-2 benzeri enzimler plazmid aracılı AmpC enzimleri arasında tüm dünyada en yaygın olanlardır²¹⁻²³ ve diğer CMY varyantları için öncül olabildiği düşünülmektedir². Ülkemizde yapılan çalışmalarda da, CMY-2 üreten *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatları saptanmıştır²⁴⁻²⁷.

Plazmid kökenli ACT benzeri enzim üreten ilk izolat Amerika'dan rapor edilmiştir⁶. Bu enzim *K.pneumoniae* türünde, CMY enzimlerinin *E.coli*'de bulunması kadar sık değildir. 1996-2006 yılları arasında sefalosporinlere dirençli *K.pneumoniae* izolatlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında, pAmpC prevalansının ülkelere ve kurumlara göre değişmekle birlikte %2.6-55 arasında yer aldığı görülmektedir^{2,28,29}. Bu çalışmalarda en sık belirlenen enzim tipi yine CMY benzeri enzimlerdir. İkinci ve üçüncü sırada ise DHA-1 ve ACT-1 benzeri enzimler gelmektedir. Türkiye verilerine bakıldığında *K.pneumoniae* izolatlarıyla yapılan çalışmalarda ACT-1'in içinde bulunduğu ACT enzim grubuna ait beta-laktamaz üretiminin gösterildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır²⁴⁻²⁷. Coşkun ve arkadaşlarının²⁶ aynı multipleks PCR yöntemiyle taradığı *K.pneumoniae* izolatlarında CIT ve MOX grubuna ait gen bölgeleri saptanmıştır. Yılmaz ve arkadaşlarının²⁷ 2013 yılında yayınlanan çalışmalarında ise, iki tür için de CIT ve MOX grubu gen bölgelerinin daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların her ikisi de farklı kurumlarda ve 2009 yılı izolatlarıyla yapılmıştır. Saptanan enzim ailelerinin ve bulundukları türlerin bizim çalışmamızdan farklı olmasının, farklı kurumlarda uygulanan antibiyotik kullanım politikaları ve yine bu kurumlara başvuran/tedavi gören hasta gruplarının özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, sefoksitine dirençli tüm izolatların %8.8'inde *pampC* genleri saptanmıştır. Sefoksitin direnci, sadece AmpC enzim üretimine bağlı değildir. Karbapenemazlar, bazı A sınıfı beta-laktamazlar ve dış membran porin kaybı sefoksitin direncine yol açabilmektedir². Çalışmamız karbapeneme duyarlı izolatları kapsadığından, sefoksitin direncine sebep olabilecek faktörler arasında karbapenemaz üretimi bulunmamaktadır; ancak diğer iki seçenek sefoksitin direncine yol açmış olabilir. Ayrıca *E.coli* izolatları için bu direnç, kromozomal *ampC* geninin yüksek ekspresyonu ile daoluşabilmektedir. Bir diğer neden ise, çok sayıda *pampC* geni (173 adet) bulunmasına karşın, uygulanan PCR yöntemiyle bunlardan en sık görülenlerin yakalanabilmesi ve özellikle yeni bulunan bazı genlerin (MOX-5, MOX-6, MOX-7, ACT-5, ACT-6, ACT-7, ACT-14, ACT-15, ACT-16) saptanamaması olabilir²⁰.

Çalışmamızda karbapenemlere dirençli izolatlar PCR taraması için seçilmemiştir. Bu durum, kan kültürlerinde üreyen *K.pneumoniae*'de karbapenemaz (OXA-48) üretiminin %30'u geçtiği (2011'de %52.6, 2012'de %31.3, 2013 ilk üç ayında %66.7) kurumumuz için doğru bir seçim kriteri olarak görülmektedir. Ancak sıklığı düşük olmakla birlikte bazı çalışmalarda^{6,30} bildirilmiş olan, pAmpC üretimi ve porin kaybı ya da pAmpC yanı sıra karbapenemaz üretimi gibi birleşik mekanizmaların değerlendirmeye alınmaması nedeniyle, pAmpC prevalansının olduğundan düşük görülmesine yol açmış olabilir. Çalışma izolatlarında, uygulanan PCR yönteminin tespit edebildiği MOX, DHA, ACC ve FOX gen bölgelerinden herhangi birine ait pozitiflik bulunmamıştır.

Sonuç olarak, PFGE sonuçları da değerlendirmeye alındığında 2007-2012 yıllarını kapsayan süre zarfında kurumumuzda AmpC prevalansı düşüktür; ancak 2011-2012 yıllarında saptanan sefoksitine dirençli izolatlar arasında artma eğilimi göstermektedir (2009 yılında %5.6, 2011 yılında %16.7, 2012 yılında %50). Bu durum, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından bir uyarı niteliğindedir. Bu çalışma, kurumumuzda pAmpC tipleri ve moleküler epidemiyolojisi konusunda yapılmış ilk çalışma olmasının yanı sıra, saptayabildiğimiz kadarıyla ülkemizde ACT enzimlerinin varlığını gösteren ilk çalışmadır.

TEŞEKKÜR

Pozitif kontrol izolatını gönderen Doç. Dr. Nisel Yılmaz'a (İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969-76.
2. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82.
3. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7): 1085-9.
4. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new beta-lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2000; 2(10): 1225-35.
5. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 1-11.
6. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 563-9.
7. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 772-7.
8. Caroff N, Espaze E, Gautreau D, et al. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(6): 783-8.
9. Park YS, Adams-Haduch JM, Shutt KA, et al. Clinical and microbiologic characteristics of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* at three centers in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(4): 1870-6.
10. Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2): 333-6.
11. Sasirekha B, Shivakumar S. Occurrence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care hospital in Bangalore. *Indian J Microbiol* 2012; 52(2): 174-9.
12. Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli*-evaluation of screening criteria and of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32(9): 1205-10.
13. Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1): 2-4.
14. Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón R, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST, December 2012. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf

15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21th Informational Supplement. Document M100-S21. 2011, CLSI, Wayne, Pa.
16. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(8): 1924-31.
17. 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.
18. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145(3): 1365-73.
19. Centers for Disease Control and Prevention. PulseNet. Available at: <http://www.cdc.gov/pulsenet>
20. Lahey Clinic. β -lactamase classification and aminoacid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Available at: www.lahey.org/studies/webt.htm
21. Cejas D, Fernández Canigia L, Quinteros M, et al. Plasmid-encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. Rev Argent Microbiol 2012; 44(3): 182-6.
22. Crémet L, Caroff N, Giraudeau C, Reynaud A, Caillon J, Corvec S. Detection of clonally related *Escherichia coli* isolates producing different CMY β -lactamases from a cystic fibrosis patient. J Antimicrob Chemother 2013; 68(5): 1032-5.
23. Muratani T, Kobayashi T, Matsumoto T. Emergence and prevalence of beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(6): 491-9.
24. Bal C, Bauernfeind A, Aydın A, Ang O. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik sefamisinaz CMY-2. Enfeksiyon Derg 1995; 9: 67.
25. Demirbakan H, Midilli K, Oğünç 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.
26. Coşkun S, Altanlar N. Sefoksitine dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 375-85.
27. Yılmaz NO, Agus N, Bozcal E, Oner O, Uzel A. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Med Microbiol 2013; 31(1): 53-9.
28. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 772-7.
29. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. J Antimicrob Chemother 2007; 59(1): 102-5.
30. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM, Tammelin A, Courvalin P, Lambert T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. J Antimicrob Chemother 2000; 46(6): 895-900.