

# Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Plazmidik AmpC Tipi Beta-Laktamaz Direncinin Araştırılması

## The Prevalence of Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamases Among Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Deniz Zehra ULUSAN,<sup>a</sup>  
Nevriye GÖNÜLLÜ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 19.10.2011  
Kabul Tarihi/Accepted: 31.05.2012

Bu çalışma, İÜ Bilimsel Araştırma Projeleri  
Fonu tarafından (Proje No 2988) desteklenmiş  
ve Gülhane Mikrobiyoloji Günleri Kongresi  
(20-22 Nisan 2010, İstanbul)'nde sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Nevriye GÖNÜLLÜ  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul,  
TÜRKİYE/TURKEY  
nevriyegonullu@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Gram negatif çomaklarda beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma, beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesidir. Bu beta-laktamaz enzimleri içerisinde plazmidik AmpC tipi beta-laktamazlar, sefamisinleri de içeren geniş bir substrat profiline sahip olmaları, oluşturdukları direncin beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilememesi, bakteriler arasında çoklu antibiyotik direncini yayabilmesi ve saptanmaları için standart yöntemlerin olmaması gibi sebeplerden dolayı önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda, laboratuvarımızda izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Ocak 2008-Eylül 2008 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının Laboratuvarlarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen sefoksitine dirençli ya da orta duyarlı 23 *Escherichia coli* ve 17 *Klebsiella pneumoniae* suşunda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile, uygun primer dizileri kullanılarak AmpC tipi beta-laktamazlara ait gen bölgeleri araştırılmıştır. **Bulgular:** Yapılan testlerde PZR ile bir *E. coli* suşunda CMY-2 geni saptanmıştır. PZR ile pozitif bulunan köken, fenotipik yöntemlerden kloksasilin inhibisyon ve modifiye Hodge testinde pozitif bulunmuştur. **Sonuç:** AmpC tipi beta-laktamaz enzimleri tüm dünyada artan sıklıkla görülmektedir, hastane enfeksiyonu nedeni olabilmektedir ve bu direnci taşıyan etkenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde ve tanısında etkin yöntemler geliştirmek önemli olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** AmpC beta laktamazlar; ilaç direnci, bakteriyel

**ABSTRACT Objective:** The most important mechanism of beta-lactam resistance in gram-negative bacilli is the inactivation of antibiotics by beta-lactam enzymes. Among these beta-lactam enzymes, plasmidic AmpC type beta-lactamases have a special place as a consequence of the following reasons: they have a broad substrate profile including cephamycins, the resistance created by them cannot be inhibited by the beta-lactamase inhibitors; they can spread a multiple antibiotic resistance among bacteria and finally there are no standard recommended methods for their detection. In this study, we have examined the availability of plasmidic AmpC type beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in our laboratory. **Material and Methods:** Twenty three *Escherichia coli* and 17 *Klebsiella pneumoniae* strains resistant or intermediately resistant to cefoxitin isolated from the various clinical samples in Cerrahpaşa Faculty of Medicine Department of Clinical Microbiology Laboratories between January 2008-September 2008 were examined. Gene areas of AmpC type beta-lactamases were investigated with polymerase chain reaction (PCR) method by utilization of appropriate primer sequences. **Results:** As a result, a CMY-2 gene was screened in one *E. coli* strain. Strain detected to be positive by PCR, was also found to be positive by phenotypic methods such as cloxacilline inhibition and modified Hodge tests. **Conclusion:** AmpC beta-lactamases appear to be increasing in prevalence around the world, can cause nosocomial outbreaks, and merit further study to define the best options for detection and treatment.

**Key Words:** AmpC beta-lactamases; drug resistance, bacterial

doi: 10.5336/medsci.2011-26981

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(6):1586-93

**B**eta-laktamlar, antimikrobiyal ajanlar içerisinde en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Ancak son zamanlarda bu antibakteriyel ajanların yaygın kullanımına paralel olarak beta-laktam antibiyotiklere direnç oranları giderek artmaktadır. Gram negatif bakterilerde bu antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. Yeni bulunan beta-laktamazların sefamisinleri, oksimino sefalosporinleri, monobaktamları ve karbapenemleri hidrolize etmesi terapötik seçeneklerin kısıtlanmasına ve tedavi başarısızlıklarına neden olduğundan endişeleri arttırmaktadır.<sup>1</sup>

Bush-Jacoby-Medeiros Grup 1, Ambler sınıf C'de bulunan AmpC beta-laktamazlar; plazmid aracılı ve kromozomal olmak üzere iki tiptir. Plazmid aracılı enzimler, kromozomal AmpC beta-laktamazlara benzer şekilde penisilinleri, oksimino sefalosporinleri, sefamisinleri ve değişken olarak aztreonamı içeren geniş spektrumlu bir beta-laktam direnci oluştururlar.

Direnç genleri, plazmid üzerinde bulduklarında, beraberinde başka antibiyotiklere direncin taşınmasına ve ilaç direncinin bakteriler arasında yayılmasına neden olduğundan, tanımlanmaları enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemlidir.<sup>2,3</sup>

Bu önemli direncin tespitinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilmiş herhangi bir kriter yoktur.<sup>4</sup> Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında AmpC beta-laktamaz üreten suşların saptanması sorun yaratmaktadır.

Çalışmamızda Ocak 2008-Eylül 2008 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen sefoksitine orta duyarlı ya da dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında, plazmidik AmpC beta-laktamazların yaygınlığının ve tiplerinin saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Ocak 2008-Eylül 2008 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na ardışık izole edilen toplam 1846 *E. coli* ve *K. pneumoniae* (1340

*E. coli* ve 506 *K. pneumoniae*) izolatu sefoksitin direnci açısından taranmıştır. Sefoksitine orta duyarlı ya da dirençli bulunan 23 *E. coli* ve 17 *K. pneumoniae* izolatu incelenmeye alınmıştır.

## İZOLATLARIN TANIMLANMASI

Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanmasında rutin yöntemler kullanılmıştır.<sup>5</sup> Klasik yöntemlerle tanımlanamayan suşlar Vitek 2 (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemle tanımlanmıştır.

## Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır.<sup>6</sup>

## Disk Difüzyon Yöntemi

Çalışmamızda incelenecek suşların antibiyotik duyarlılık durumlarının araştırılması amacıyla ampisilin (10 µg), sefazolin (30 µg), sefuroksim (30 µg), sefoksitin (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefpodoksim (10 µg), sefepim (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), amoksisilin-klavulanat (20/10 µg), ampisilin-sulbaktam (10/10 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), sefotaksim-klavulanat (30/10 µg), seftadizim-klavulanat (30/10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), netilmisin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), norfloksasilin (10 µg), trimetoprim-sulfometoksazol (1,25/23,75 µg), nitrofurantoin (300 µg) diskleri (Oxoid, UK) kullanılmıştır.

Antibiyogramların değerlendirilmesinde CLSI standartları kullanılmıştır.<sup>6</sup> Sefoksitine orta duyarlı ya da dirençli olan izolatlar ileri incelemeye alınmıştır.

## Agar Dilüsyon Yöntemi

Çalışmaya alınan izolatların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI standartlarına uyularak agar dilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Ampisilin (Fako), sefoksitin (Bilim), sefotaksim, seftazidim, amikasin (İ.E. Ulagay), sefepim (Mustafa Nevzat), imipenem (Merck Sharp&Dohme), siprofloksasin, gentamisin (Sigma) için MİK değerleri belirlenen aralıkta iki kat seri dilüsyon yapılarak belirlenmiştir.<sup>6</sup>

Agar dilüsyon yönteminde ATCC 25922 *E. coli* ve ATCC 29213 *S. aureus* kontrol suşları kullanılmıştır.

## FENOTİPİK YÖNTEMLER

### Kloksasilin İnhibisyon Testi

Agar dilüsyon yöntemiyle sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri belirlenirken, paralelinde 100 µg/ml kloksasilin eklenerek bu antibiyotiklerin seri dilüsyonları da hazırlanmıştır. Kloksasilin-sefalosporin içeren besiyerlerinde bulunan MİK değerlerinde, kloksasilin bulunmayan besiyerlerinde saptanan MİK değerlerine göre  $\geq 2$  kat azalma olması pozitif kabul edilmiştir.<sup>7</sup>

### Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testi Yong ve ark.nın yöntemine uygun olarak metallo-beta-laktamazların tespitinde kullanılan imipenem diski yerine sefoksitin diski yerleştirilerek yapılmıştır.<sup>8</sup>

## MOLEKÜLER YÖNTEMLER

### Plazmid İzolasyonu

Sefoksitin dirençli ya da orta duyarlı bulunan suşların plazmid ekstraksiyonu *AbsoGene Plasmid DNA Isolation Kit*'i (RTA, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR'de arayacağımız gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primerler Tablo 1'de gösterilmiştir.<sup>9</sup> Pozitif kontrol olarak CMY-2 üreten kontrol suş Prof.Dr. Adolf Bauernfeind'dan (Micoer Institute, Münih, Almanya) temin edilmiştir.

PZR yöntemi son hacmi 25 µL olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla temel amplifikasyon karışımı 1. ve 2. aşama PZR işlemleri için 2,5 µL 10x Taq polimeraz tamponu (100 mM Tris HCl ve 500 mM KCl), 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL dNTP karışımı (her bir dNTP'den 25 mM) ve 0,125 µL Taq Polimeraz (5 U/µL) şeklinde hazırlandı. Bu karışıma 1. aşama PZR için Tablo 1'de verilen ilgili genlere ait 1. aşama düz ve ters primerleri (25 pmol/µL) her biri 0,5 µL olacak şekilde eklendi. Karışıma ayrıca 5 µL örnek DNA'sı eklendi. Birinci aşama PZR reaksiyonuna 14,5 µL DNaz RNaz içermeyen deiyonize su eklenerek 25 µL'lik son hacim elde edildi. İkinci aşama PZR için Tablo 1'de verilen ilgili genlere ait 2. aşama düz ve ters primerleri (25 pmol/µL) her biri yine 0,5 µL olacak şekilde eklendi. Karışıma hedef DNA olarak 1. aşama ürünü 1 µL hacminde eklendi. 2. aşama PZR reaksiyonuna 18,5 µL DNaz RNaz içermeyen deiyonize su ilavesi ile 25 µL'lik son hacim elde edildi.

**TABLO 1:** Kullanılan primerlerin DNA dizisi, nükleotid pozisyonu, ortalama boyutları.

Gen ve primerin adı	DNA dizisi	Nükleotid pozisyonu	Ortalama boyut (bp)
<i>bla</i> <sub>CMY-1</sub> , <i>bla</i> <sub>FOX</sub> , <i>bla</i> <sub>MOX</sub>			
C1	5'-GAGCAGACCCTGTTCGAGAT-3'	570	846
C2	5'-GATTGGCCAGCATGACGATG-3'	1416	
C3	5'-TACTCCAACCCAGCATAGG-3'	852	519
C4	5'-CCACATAGGCGCCAAAGCC-3'	1371	
<i>bla</i> <sub>CMY</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC(Citrobacter freundii)</sub> , <i>bla</i> <sub>LAT</sub> , <i>bla</i> <sub>BIL</sub>			
CA1	5'-TGCTGCTGACAGCCTCTTTC-3'	71	1106
CA2	5'-TTTCAAGAATGCGCCAGGCC-3'	1177	
CA3	5'-GCGATCCGGTCACGAAATAC-3'	359	426
CA4	5'-ATAACGCTGGATTTACGCCA-3'	785	
<i>bla</i> <sub>MIR</sub> , <i>bla</i> <sub>AmpC(Enterobacteriaceae)</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT</sub>			
M1	5'-CTATAAGTAAAACCTTCACCGG-3'	1178	870
M2	5'-TATGCCGCCTCAACGCGTG-3'	2048	
M3	5'-TGCGCTTTTATCAAACCTGGCA-3'	1382	585
M4	5'-GCCACGTAGCTGCCAAACC-3'	1967	

Gerek 1. aşama gerek 2. aşama PZR yönteminde öncelikle 95°C'de 2 dakikalık ilk denatürasyon aşaması uygulandı ve ardından 45 döngülük 95°C'de 30 saniye, 50°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakikalık döngüsel çoğaltma programı uygulandı. Çoğaltma sonrası ürünler 72°C'de 5 dakikalık inkübasyon ile son uzama işlemine tabi tutuldu ve 4°C'de ileri işlemler uygulanıncaya kadar saklandı.

Amplifikasyon işleminin ardından PZR ürünleri etidyum bromür (EB) içeren 0,5 X TBE ile hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bunun için PZR ürünlerinden 7 µL alınarak 3 µL yükleme tamponu ile karıştırıldı 100 V'da 1 saat yürütüldü. Oluşan bantlar ultraviyole translüminatörde incelendi.

#### DNA Dizi Analizi

PZR ile plazmidik AmpC beta-laktamaz varlığı saptanan örnekte ikinci aşama PZR primerleri kullanılarak dizi analizi yapıldı. Jelde yürütme işleminden sonra kesilen DNA bandı High Pure PZR Product Purification Kit'i (Roche Applied Science, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan PZR ürünü "cycle sequencing" işleminde kullanıldı. "Cycle sequencing" işlemi için 95°C'de 7,5 dakikalık ilk denatürasyon ve sonrasında 35 döngülük 95°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dakikadan oluşan program kullanıldı.

Daha sonra "cycle sequencing" ürünü içerisinde Sephadex G50 (Sigma, ABD) bulunan kolondan geçirilerek saflaştırıldı, saflaştırılan ürün ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklendi. Elde edilen dizi DNA Star programı içerisinde yer alan Seqman programı ile düzeltildi, düzeltilen dizi internet üzerinde BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki dizilerle karşılaştırıldı ve CMY-2 ile %100 uyumlu bulundu.

#### Konjugasyon Deneyi

PZR testi ile plazmidik AmpC pozitif bulunan suşun sefoksitine direnç özelliğini alıcı *E. coli* K12 Rif<sup>R</sup> alıcı suşuna aktarımını aktarmadığı konjugasyon deneyi ile araştırıldı. Bunun için PZR ile AmpC pozitif saptanan sefoksitin dirençli, laktoz pozitif suşun (verici) ve alıcı suşun (*E. coli* K12 Rif<sup>R</sup> /se-

foksitin duyarlı, laktoz negatif) 24 saatlik kültürlerinden alınan koloniler, 5 mL Müller Hinton broth'a ekildi ve 37°C'de çalkalamalı etüvde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her tüpten birer mililitre alınarak karıştırıldı. Yirmi dört saat 37°C'de inkübe edilen karışım, sefoksitin (1 µg/mL) içeren Mac Conkey besiyerine ekildi, üreyen laktoz negatif kolonilerin tanımlandı ve antibiyotik duyarlılıkları araştırıldı.

## BULGULAR

Sefoksitine orta duyarlı ya da dirençli bulunan 23 *E. coli* ve 17 *K. pneumoniae* suşu gelen idrar (n=26), hemokültür (n=5), yara sürüntüsü (n=1), balgam (n=1), doku parçası (n=2), biyopsi örneği (n=1), apse (n=2), asit sıvısı (n=2), amputasyon örneği (n=1), aspirasyon örneği (n=1) gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilmiştir. Örneklerin %47,5'i yatan hastalardan, kalan %52,5'i ayaktan tedavi edilen poliklinik hastalarından gelmiştir.

23 *E. coli* suşunun 12'sinde (%52,23 *E. coli* suşunun 12'sinde (%52,23 *E. coli* suşunun 12'sinde (%52,23 *E. coli* suşunun 12'sinde (%52,23 *E. coli* suşunun 12'sinde (%52,17 *K. pneumoniae* suşundan 13'ünde (%76,5) GSBL tespit edilmiştir.

*E. coli* izolatlarının disk difüzyon testi sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

*K. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon testi sonuçları Tablo 3'te özetlenmiştir.

#### AGAR DİLÜSYON TESTİ SONUÇLARI

Agar dilüsyon yöntemi ile *E. coli* izolatlarının %82,6'sı sefoksitine dirençli, %17,4'ü sefoksitine orta duyarlı bulunmuştur. *E. coli* izolatlarında ampiciline %91,3 ve siprofloksasine %73,9 oranında direnç saptanmıştır. İmipenem ve amikasin en etkili antibiyotikler olarak bulunmuştur.

*K. pneumoniae* izolatlarının %88,2'si sefoksitine dirençli, %11,8'i sefoksitine orta duyarlı bulunmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarında ise sefotaksime %58,8, seftazidime %64,7, sefepime %64,7 ve siprofloksasine %76,5 oranında direnç saptanmıştır. *E. coli* izolatlarına benzer şekilde imi-

**TABLO 2:** *E. coli* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları.

Duyarlılık durumu (%) Antibiyotikler	S	I	R
Ampisilin	4,3	4,3	91,3
Aztreonam	47,8	13	39,1
Sefoksitin	–	65,2	34,8
Sefpodoksım	26,1	–	73,9
Sefotaksim	47,8	8,7	43,5
Seftazidim	65,2	8,7	26,1
Sefepim	56,5	17,4	26,1
Sefuroksim	17,4	8,7	73,9
Sefazolin	17,4	8,7	73,9
Amoksisilin-klavulanat	17,4	39,1	43,5
Piperasilin-tazobaktam	82,7	13	4,3
Ampisilin-sulbaktam	17,4	21,7	60,9
İmipenem	100	–	–
Amikasin	60,9	4,3	34,8
Gentamisin	52,2	–	47,8
Netilmisin	60,9	26,1	13
Siprofloksasin	21,7	–	78,3
Norfloksasin	21,7	–	78,3
Levofloksasin	21,7	–	78,3
Trimetoprim-Sulfometoksazol	60,9	4,3	34,8

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli.

penem ve amikasin en etkili antibiyotikler olarak saptanmıştır.

Suşların MİK değerleri Tablo 4'te görülmektedir.

PZR ile CMY-2 pozitif saptanan izolat sefoksitin MİK değeri >256 µg/mL olan tek izolattır (Tablo 4).

### FENOTİPİK YÖNTEMLERİN SONUÇLARI

*K. pneumoniae* izolatlarından biri kloksasilin inhibisyon testi ile, 10'u modifiye Hodge testi ile pozitif bulunmuş, pozitif kökenlerden hiçbirinde moleküler yöntemlerle plazmidik AmpC beta-laktamaz saptanamamıştır. *E. coli* izolatlarından altısı kloksasilin inhibisyon testi ile, 12'si modifiye Hodge testi ile pozitif bulunmuştur. Sadece bir *E. coli* izolatında PZR ile CMY-2 tipi plazmidik AmpC beta-laktamaz saptanmıştır. CMY-2 geni saptanan *E. coli* izolatı hem kloksasilin inhibisyon testi hem de modifiye Hodge testi ile pozitif bulunmuştur (Tablo 4).

### PZR TESTİ VE DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

PZR testi ile bir *E. coli* izolatında CMY-2 geni saptanmış ve DNA dizisi analizi ile doğrulanmıştır. Pozitif izolat bir poliklinik hastasının idrar örneğinden izole edilmiştir (Resim 1).

Yapılan konjugasyon deneyinde PZR ile AmpC pozitif bulunan izolatın alıcı izolata sefoksitin direncini aktaramadığı gösterilmiştir.

Plazmidik AmpC beta-laktamazların sıklığı *E. coli* izolatları arasında % 0,07 (1/1340 izolat) olarak saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatları arasında saptanamamıştır.

### TARTIŞMA

Plazmid bağımlı AmpC beta-laktamaz enzimleri ilk olarak 1988 yılında *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında bildirilmiştir. Bu enzimlerin plazmidler yoluyla bakteriler arasında yayılabilmesi enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sorunlara sebep ol-

**TABLO 3:** *K. pneumoniae* suşların disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları.

Duyarlılık durumu (%) Antibiyotikler	S	I	R
Ampisilin	–	–	100
Aztreonam	17,6	11,8	70,6
Sefoksitin	–	41,2	58,8
Sefpodoksım	17,6	5,9	76,5
Sefotaksim	23,5	29,4	47,1
Seftazidim	41,2	11,8	47
Sefepim	58,8	11,8	29,4
Sefuroksim	5,9	11,8	82,3
Sefazolin	11,8	–	88,2
Amoksisilin-klavulanat	23,5	47,1	29,4
Piperasilin-tazobaktam	41,2	17,6	41,2
Ampisilin-sulbaktam	29,4	23,5	47,1
İmipenem	100	–	–
Amikasin	47,1	5,8	47,1
Gentamisin	82,4	–	17,6
Netilmisin	82,4	5,8	11,8
Siprofloksasin	23,5	–	76,5
Norfloksasin	23,5	5,8	70,6
Levofloksasin	23,5	–	76,5
Trimetoprim-Sulfometoksazol	82,4	–	17,6

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli.

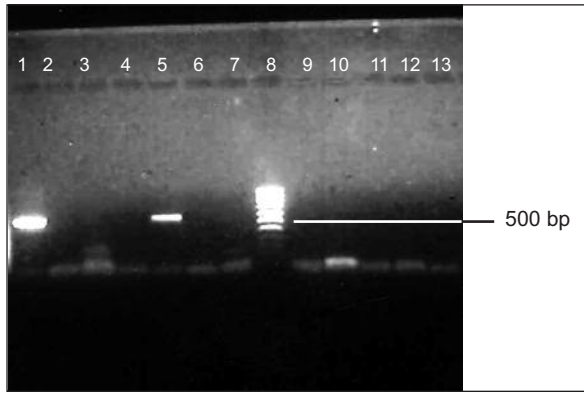
TABLO 4: İzolatların MİK değerleri, GSBL sonuçları, PZR ve fenotipik yöntemlerin bulguları.

	GSBL	AmpC beta- laktamaz	AM	CAZ	CTX	FOX	FEP	IPM	AN	GM	CIP	Kloksasilin inhibisyon testi	Modifiye Hodge testi
E1	+	-	512	16	8	128	0,25	0,5	1	0,5	0,03	+	-
E2	+	-	>512	16	512	32	>256	0,5	1	0,5	32	-	-
E3	+	CMY-2	>512	64	64	>256	2	0,25	8	128	64	+	+
E4	-	-	256	16	4	128	0,25	0,12	2	1	0,03	+	-
E5	-	-	64	0,25	0,06	16	0,12	0,25	1	0,5	0,06	-	+
E6	-	-	512	0,5	0,5	16	1	0,5	16	2	>128	-	-
E7	-	-	>512	>512	>512	128	256	0,5	64	64	>128	-	+
E8	+	-	>512	32	128	32	64	0,25	8	128	>128	-	-
E9	-	-	>512	2	2	128	4	4	4	2	128	-	+
E10	+	-	>512	32	256	32	64	0,25	8	256	>128	-	+
E11	+	-	>512	32	128	32	64	0,5	8	128	>128	-	-
E12	-	-	256	0,5	0,5	256	2	0,25	8	2	64	-	-
E13	-	-	256	4	4	64	0,12	1	2	0,25	0,03	+	+
E14	+	-	>512	32	64	32	64	0,25	8	128	128	-	+
E15	+	-	>512	128	512	32	256	0,5	16	>256	0,03	-	-
E16	+	-	>512	64	256	32	128	0,5	4	1	128	-	+
E17	-	-	64	0,25	0,12	128	0,06	0,5	2	1	0,03	+	-
E18	+	-	>512	16	256	64	64	0,25	8	128	>128	-	+
E19	+	-	>512	8	32	16	64	0,5	8	>256	64	-	-
E20	-	-	256	1	0,5	32	0,5	0,25	8	1	>128	+	+
E21	+	-	>512	128	256	32	0,5	0,5	8	1	64	-	-
E22	-	-	4	0,25	0,06	16	0,12	0,5	2	32	128	-	+
E23	-	-	4	0,5	0,12	32	0,25	0,5	4	0,5	32	-	+
K1	+	-	>512	64	512	32	256	0,25	8	0,5	>128	-	+
K2	+	-	>512	256	1024	128	>256	0,5	4	1	>128	-	+
K3	+	-	>512	64	256	128	128	0,5	2	0,5	>128	-	+
K4	-	-	>512	1	0,06	16	0,5	0,5	0,5	0,25	16	-	-
K5	+	-	>512	64	512	128	128	0,25	4	1	>128	-	+
K6	+	-	>512	8	32	16	64	1	1	8	0,03	-	+
K7	+	-	>512	64	256	64	64	2	16	1	>128	-	+
K8	+	-	>512	16	32	32	8	0,5	0,5	0,25	64	-	-
K9	-	-	>512	32	256	128	64	0,5	8	128	128	-	-
K10	+	-	>512	64	512	32	128	1	16	0,5	128	-	-
K11	-	-	64	0,5	0,5	64	0,5	0,5	2	0,5	64	-	-
K12	+	-	>512	512	64	32	32	0,25	64	128	>128	-	+
K13	-	-	64	1	0,5	32	0,25	0,25	1	0,5	0,5	-	-
K14	+	-	>512	32	256	32	64	0,5	2	0,5	>128	-	+
K15	+	-	>512	256	32	128	16	0,5	32	2	>128	-	-
K16	+	-	>512	8	32	32	64	0,25	1	0,25	0,12	-	+
K17	+	-	>512	128	64	256	2	0,5	2	1	0,03	+	+

AM: Ampisilin; CAZ: Seftazidim; CTX: Sefotaksim; FOX: Sefoksitin; FEP: Sefepim; IPM: İmipenem; AN: Amikasin; GM: Gentamisin; CIP: Siprofloksasin; GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz .

maktadır. Çalışmamızda klinik örneklerden sıklıkla izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında plazmidik AmpC varlığı moleküler ve fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

Plazmidik AmpC tipi beta-laktamazların sıklığı ve tipleri birçok ülkeden birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.



**RESİM 1:** CMY-2 pozitif saptanan suşun PZR sonucu.

Sütun 1: CMY-2 pozitif kontrol (519 bp)

Sütun 2: Negatif kontrol

Sütun 5: CMY-2 pozitif saptanan suş

Sütun 8: 100 basamaklı size marker.

Empel ve ark. Polonya'da 2003-2004 yılları arasında 13 hastanede yatan hastalardan izole edilen 2388 *Enterobacteriaceae* kökeninde plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz varlığını araştırmışlar, 71 *Proteus mirabilis* suşundan 19'unda CMY-15, dördünde CMY-12, bir suşta CMY-38 bulmuşlardır.<sup>10</sup>

Yamasaki ve ark. tarafından Japonya'da yapılan çalışmada toplam 22.869 *Enterobacteriaceae* suşu plazmidik AmpC beta-laktamaz varlığı açısından araştırılmıştır ve 20 CMY-2, 6 DHA-1, 2 CMY-8 ve 1 MOX-1 tipi plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz saptanmıştır.<sup>11</sup>

Hanson ve ark.nın 2005 yılında Amerika'da yaptığı çalışmada çeşitli kliniklerde yatan ve ayakta tedavi edilen hastaların idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen 1433 *E. coli* ve 214 *Klebsiella* spp. suşuna CLSI önerilerine göre disk difüzyon testi yapılmış, sefoksitin ve sefpodoksim duyarlılığı azalmış 75 *E. coli*, 14 *Klebsiella* spp. suşunda AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır. Dokuz *E. coli* suşunda (%12) ve bir *K. pneumoniae* (%7) suşunda PZR ve dizi analizi ile CMY-2 tipi plazmidik AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir.<sup>12</sup>

Adler ve ark.nın 2006-2007 yılları arasında İsviçre'de yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 3217 suştan (2434 *E. coli*, 174 *K. oxytoca*, 459 *K. pneumoniae*, 8 *Klebsiella* spp., 134 *P. mirabilis*, 7 *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ve 1 *Shigella flexneri*) sefoksitin dirençli 124 suşta

(103 *E. coli*, 3 *K. oxytoca*, 18 *K. pneumoniae*) multipleks PZR yöntemi ile plazmidik AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır.<sup>13</sup> Beş *E. coli* suşunda plazmid bağımlı AmpC beta-laktamaz saptanmıştır.<sup>13</sup>

Woodford ve ark. tarafından 2004-2006 yılları arasında İngiltere'de, 135 *E. coli* ve 38 *Klebsiella* spp. suşunda plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır.<sup>14</sup> Bu çalışmada, *E. coli* suşlarının %49'unda, *K. pneumoniae* suşlarının %55'inde plazmidik AmpC enzimi saptanmıştır. AmpC tipi beta-laktamaz saptanan suşların, 60'ı CMY-23, 14'ü ACC tip beta-laktamaz, 11'i FOX tipi beta-laktamaz, üç suş ise DHA tipi AmpC beta-laktamaz olarak tespit edilmiştir.<sup>14</sup>

Ülkemizde AmpC beta-laktamaz varlığının araştırılması ile ilgili ilk çalışma 1995 yılında Bal ve ark. tarafından yapılmıştır.<sup>15</sup> Böbrek nakli yapılmış hastalardan izole edilen 14 çoğul dirençli *K. pneumoniae* suşunda CMY-2 tipi AmpC beta-laktamaz saptanmıştır.<sup>15</sup>

Demirbakan ve ark. 2005-2006 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmada, sefoksitine dirençli ya da az duyarlı 14 *Klebsiella* spp. ve 27 *E. coli* suşundan iki *E. coli* izolatında CMY-2 tipi AmpC beta-laktamaz varlığı saptanmıştır.<sup>16</sup>

Çalışmamızda taranan toplam 1340 *E. coli* suşu arasında sefoksitine dirençli bulunan 22 *E. coli* suşundan PZR testi ile bir CMY-2 tipi AmpC beta-laktamaz (% 0,07) saptanmıştır. Bu oran Avrupa, Asya ve Amerika ülkeleriyle uyumludur.<sup>11</sup> *K. pneumoniae* izolatlarında plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz bulunmamıştır. CMY-2 pozitif bulunan *E. coli* suşu, fenotipik yöntemlerden modifiye Hodge ve kloksasilin inhibisyon testlerinin her ikisinde de pozitif bulunmuştur. Gerek modifiye Hodge testi, gerek kloksasilin inhibisyon testi ile pozitif suş sayısının PZR'ye göre daha fazla olması, laboratuvar koşullarına ve yorum güçlüklerine bağlanmıştır.<sup>17,18</sup>

Plazmidik AmpC geni taşıyan suşlar plazmid üzerinde AmpC genine ek olarak diğer ilaç direnç genlerini de sıklıkla taşıdığından plazmid kökenli AmpC beta-laktamaz saptanan suşlarda genellikle

çoklu ilaç direnci vardır. Ayrıca bu suşlarda plazmidik AmpC beta-laktamaz enzimlerine ek olarak dış membran geçirgenliğinin azalması ile karbapenem direnci gelişebilir.

Ding ve ark.nın Çin'de yaptıkları çalışmada 494 *E. coli* ve 637 *K. pneumoniae* suşunda multipleks PZR yöntemi ile 74 kökenin plazmid bağımlı AmpC beta-laktamaz ürettiğini saptamışlar, bulunan AmpC pozitif kökenlerin %74,4'ü gentamisin, %38,5'i amikasin, %75,6'sı siprofloksasiline dirençli bulunmuştur.<sup>19</sup> Kökenlerin hepsi imipeneme duyarlı olarak bildirilmiştir.<sup>19</sup>

Çalışmamızda da CMY-2 pozitif saptanan *E. coli* izolatu gentamisine ve siprofloksasiline dirençli, amikasin ve imipeneme duyarlı bulunmuştur.

Plazmidik AmpC beta-laktamaz saptanan suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde öncelikle karbapenemler kullanılmalıdır. Suşlar florokinolonlara duyarlı bulunursa, florokinolonlar diğer bir tedavi seçeneği olabilir. Ayrıca yeni antibiyotiklerden tigesiklin de önerilebilir.

Sonuç olarak, dünyayla paralel şekilde beta-laktam antibiyotiklerin sık kullanıldığı ülkemizde, AmpC tipi beta-laktamaz yaygınlığının saptanması, bu dirence sahip etkenlerle oluşan enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etkin yöntemler geliştirilmesinde ve sağlam bir epidemiyolojik veri oluşturulmasında önemlidir. Ancak izolatlarımızın azlığı göz önüne alındığında, bu konuda yapılan çalışmaların çok merkezli yapılmasının çok daha faydalı olacağı bir gerçektir.

## KAYNAKLAR

- Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3110-3.
- Girlich D, Naas T, Bellais S, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(6):1470-8.
- Aktaş Z, Gönüllü N, Kayacan ZÇ, Anđ Ö, Caratolli A, Yong D, et al. [CTX-M-15 carried on Incn-type plasmids in *Klebsiella pneumoniae*]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(6):1355-64.
- Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 2007;11(3):191-7.
- Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. *The Enterobacteriaceae*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p.960-1.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2007; Seventeenth Informational Supplement. Document M100-S17.
- Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(6):616-8.
- Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. 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.
- Lee SH, Jeong SH, Lee KJ. Evolution of TEM beta-lactamase genes identified by PCR with newly designed primers in Korean clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(2):98-100.
- Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, et al. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(7):2449-54.
- Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3267-73.
- Hanson ND, Moland ES, Hong SG, Propst K, Novak DJ, Cavalieri SJ. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(10):3814-6.
- Adler H, Fenner L, Walter P, Hohler D, Schultheiss E, Oezcan S, et al. Plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(2):457-8.
- Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RL, Hopkins KL, Kaufmann ME, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(1):102-5.
- Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE, Anđ Ö. Plasmidic cephalinase CMY-2 in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *İnfeks Derg* 1995;19(1):67-71.
- Demirbakan H, Midilli K, Ögünç D, Özen N, Öngüt G, Dağlar D, et al. [Investigation of plasmid-mediated ampc beta-lactamase types in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* isolates resistant or intermediate to cefoxitin]. *Bulletin of Microbiology* 2008;42(4):545-51.
- da Silva Dias RC, Borges-Neto AA, D'Almeida Ferraiuoli GI, de-Oliveira MP, Riley LW, Moreira BM. Prevalence of AmpC and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(1):79-87.
- Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(6):616-8.
- Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al. 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.