

Enterobacteriaceae Suşlarında Plazmid Kökenli AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Multipleks PZR ve Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması †

Kamer KOLDAŞ *, İpek MUMCUOĞLU *, Zeynep Ceren KARAHAN **, Feride Alaca COŞKUN *, Şenol KURŞUN *, Neriman AKSU *

* Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen Enterobacteriaceae suşlarında multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle ampC genlerinin tespit edilmesi ve 3-aminofenilboronik asit bazlı disk difüzyon testleriyle AmpC tipi beta-laktamaz varlığının fenotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Klinik örneklerden izole edilen 553 Enterobacteriaceae suşu çalışmaya alınmıştır. Disk difüzyon testinde sefoksitin zon çapı 18 mm'den az olan suşlara ampC geni varlığının araştırılması amacı ile MOX, CIT, DHA, ACC, EBC, FOX primerleri kullanılarak multipleks PZR uygulanmıştır. AmpC geni tespit edilen suşlar çift disk sinerji testi (ÇDST), inhibitör-potansiyalizasyon disk difüzyon (IPDD) ve Coudron'un disk potansiyalizasyon testi ile fenotipik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Sefoksitin inhibisyon zon çapı <18 mm olarak saptanan 46 suşun 16'sında multipleks PZR ile ampC geninin varlığı gösterilmiştir. On suşun (iki *Klebsiella pneumoniae*, sekiz *Escherichia coli*) EBC geni taşıdığı belirlenirken dört *E. coli* suşunun CIT, bir *E. coli* suşunun MOX, bir *E. coli* suşunun da FOX geni taşıdığı tespit edilmiştir. Coudron'un disk potansiyalizasyon testi ile gen pozitif 16 suşun tamamı pozitif olarak belirlenirken, IPDD ile 15 suş ve ÇDST ile 13 suş pozitif bulunmuştur.

Sonuç: Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar hızlı yayıldıkları, rutin duyarlılık testlerinde tanımlanamadıkları ve tedavide başarısızlığa yol açtıkları için surveyanslarının yapılması gereklidir. Bu genlerin tespitinde en güvenilir yöntem PZR analizi olmakla birlikte rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek fenotipik tarama testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda fenotipik üç test karşılaştırılmış ve PZR ile en uyumlu sonuçları veren Coudron'un disk potansiyalizasyon testinin AmpC beta-laktamaz taramalarında rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek kolay, ekonomik ve güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

SUMMARY

Investigation of Plasmid Mediated AmpC Beta-Lactamases in Enterobacteriaceae Strains by Multiplex PCR and Phenotypic Methods

Objective: This study was aimed to determine the presence of plasmid mediated AmpC type beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae by phenotypic and genotypic methods.

Materials and Methods: Five hundred and fifty three Enterobacteriaceae strains isolated from clinical specimens were included in the study. Strains which had a zone diameter less than 18mm in cefoxitin disc diffusion test were investigated for the presence of AmpC genes by multiplex PCR using MOX, CIT, DHA, ACC, EBC, FOX primers. The isolates were also tested phenotypically for the presence of AmpC beta-lactamases by using 3-aminophenylboronic acid based disc diffusion methods. Strains which were positive for AmpC gene were investigated by double disc synergy test (DDST), inhibitor potentiation disc diffusion (IPDD) and Coudron's disc potentiation test.

Results: In 16 of 46 strains which had cefoxitin inhibition diameter smaller than 18 mm ampC gene was determined by multiplex PCR. EBC type AmpC beta-lactamases were detected in 10 strains (two *Klebsiella pneumoniae*, eight *Escherichia coli*), CIT type in four *E. coli* strains, MOX type in one *E. coli* strain and FOX type in other one *E. coli* strain. While all of the 16 gene positive strains were determined by Coudron's disc potentiation test method, 15 strains were found by IPDD and 13 strains were detected by DDST.

Conclusion: Plasmid mediated AmpC beta-lactamases which spread rapidly, are usually not detected by routine susceptibility tests which might lead to treatment failure. Thus surveillance of these enzymes are of concern especially in the nosocomial setting. PCR based detection tests are the most reliable methods for the determination of these genes, however, phenotypical screening and confirmation tests suitable for use in the routine laboratory are needed. In this study we examined three phenotypic test methods for the determination of plasmid mediated AmpC beta-lactamases and Coudron's disc potentiation test was found to exhibit highest correlation with PCR. Thus Coudron's disc potentiation test may be used as the most suitable, easy, economical and reliable method for the determination of plasmid mediated AmpC beta-lactamases in routine laboratory.

Anahtar kelimeler: AmpC beta laktamaz, fenotipik tarama testi, multipleks PZR

Key words: AmpC beta lactamase, phenotypic test, multiplex PCR

Alındığı tarih: 23.11.2010

Kabul tarihi: 21.03.2011

Yazışma adresi: İpek Mumcuoğlu, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ülkü Mahallesi Talatpaşa Bulvarı No:5 06100 Altındağ Ankara

e-posta: ipekmumcuoglu@hotmail.com

† Bu çalışma, 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (07-11 Kasım 2010 Girne, KKTC) poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direnç yol açan en önemli mekanizma beta-laktamaz enzimleridir. Birçok beta-laktam antibiyotiğin 1980'lerden itibaren kullanıma girmesi ile eşzamanlı olarak beta-laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiştir ⁽¹⁾.

AmpC tipi beta-laktamazlar; Ambler sınıflandırmasında C grubunda, Bush-Jacoby-Mederios sınıflandırmasında da grup I'de yer alan beta-laktamazlardır ⁽²⁾.

Plazmid kökenli AmpC tipi enzimler ilk olarak 1989'da tanımlanmıştır ^(2,3). Kromozomal kökenli enzimler indüklenebilir özelliğe sahipken, plazmid kökenli AmpC tipi enzimler indüklenebilir değildirler (DHA-1, DHA-2, ACT-1 ve CMY-13 genleri indüklenebilir) ve sürekli yüksek düzeyde enzim yapımı söz konusudur ⁽⁴⁾. Dirençli suşlarda, aynı plazmid üzerinde ampC genine ek olarak sıklıkla, diğer geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) genleri de bulunur ve bu suşlar birçok antibiyotik türüne direnç gösterirler ⁽³⁻⁶⁾.

Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar aktarılabılır olma özelliğine sahip olduklarından kolayca yayılabilmekte ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde salgınlara yol açabilmektedirler ⁽⁵⁾.

Bu tür enzimler en sık *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* türleri, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* ve *Citrobacter freundii* gibi türlerde saptanmıştır. Enzimlerin 7–180 kb'lık plazmidlerce taşındıkları ve izoelektrik noktalarının 6.4–9.4 arasında değiştiği belirlenmiştir ⁽³⁾.

Geliştirilmiş multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği plazmid ya da kromozomal kökenli suş ayırımında ve plazmid kökenlileri ailelerine göre gruplandırmada yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir ⁽⁷⁾. Plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar, kodlayan genlere göre beş aile olarak tanımlanmıştır ^(1,3).

AmpC beta-laktamaz üreten suşlar, GSBL üreten suşlara karşı genellikle stabil kalan beta-laktam/beta-

laktamaz kombinasyonlarına ve sefamisinleri de içeren çoğu beta-laktam antibiyotiğe dirençlidir. Geleneksel antibiyotik duyarlılık testlerinde, sınıf C beta-laktamaz üreten çoğu organizma geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı gibi görünür ve bu durumda plazmid aracılı AmpC tipi beta-laktamaz üreten organizmalarla enfekte bir hasta sefalosporinlerle tedavi edildiğinde başarısız klinik sonuçlar alınır. Gram negatif bakterilerde plazmid aracılı sınıf C beta-laktamaz üretimini tespit etmek doğru klinik uygulamalar için gereklidir. Plazmid aracılı sınıf C beta-laktamaz üreten suşlara geleneksel Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kuralları ile GSBL taraması yapıldığında; GSBL fenotipik doğrulama testi negatif çıkacaktır bunun sonucunda geniş spektrumlu sefalosporinlere yanlışlıkla duyarlı rapor edilecektir.

AmpC tipi beta-laktamaz varlığını değerlendirmede henüz CLSI'nin önerdiği bir metot bulunmamaktadır. Klinik laboratuvarlarda kullanılabilecek basit ve güvenilir tanımlama metotlarının eksikliğinden dolayı bu enzimlerin gerçek prevalansı bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda boronik asit bileşenleri *Enterobacteriaceae*'de bulunan plazmid kökenli AmpC enzimlerinin tespitinde kullanılmaktadır ^(8,9). Boronik asitten aynı zamanda karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının fenotipik değerlendirilmesinde ve AmpC aşırı üretiminden kaynaklanan direncin karbapenemaz kaynaklı dirençten ayırt edilmesinde de yararlanılmaktadır ⁽¹⁰⁾.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında multipleks PZR yöntemiyle ampC genlerinin ve 3-aminofenilboronik asit (AFB) bazlı disk testleriyle AmpC tipi beta-laktamaz varlığının araştırılması ve gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 553 *Enterobacteriaceae* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 GN kartları (bioMérieux-France) kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri, CLSI önerilerine uygun olarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır ⁽¹¹⁾. Tüm suşlara GSBL varlığının

araştırılması amacı ile CLSI önerilerine göre fenotipik doğrulanma testi uygulanmıştır.

Disk difüzyon testinde sefoksitin (30 µg) zon çapı <18 mm olan suşlar, AmpC tipi beta-laktamaz varlığının araştırılması amacı ile ileri çalışmalara alınmıştır⁽⁹⁾. Bu amaçla çalışmaya dahil edilen suşlara öncelikle multipleks PZR uygulanıp ampC geni taşıyan suşlar belirlenmiş ve ampC geni tespit edilen suşlara boronik asit ile çift disk sinerji testi (ÇDST), inhibitör-potansiyalizasyon disk difüzyon (IPDD) ve Coudron'un geliştirdiği disk potansiyelizasyon testi yöntemleri uygulanmıştır⁽⁸⁻¹⁰⁾.

PZR için DNA ekstraksiyonu: Kanlı agar üzerinde üretilen suşlardan tek koloni alınarak 500 µl buyyon içinde süspanse edilmiş ve bir gece 37°C'da bekletilmiştir. Daha sonra süspansiyon 17.310 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki süpernatant dökülerek kalan çökelti üzerine 250 µl steril distile su eklenmiştir. Santrifüj işlemi 17.310 g'de 5 dakika daha tekrarlanmış, süpernatant dökülerek kalan çökelti üzerine tekrar 250 µl steril distile su eklenmiştir. Kuru ısıda 95°C'da 10 dakika tutularak hücreler patlatılmıştır. Son olarak 17.310 g'de 5 dakika santrifüj uygulanarak süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmıştır⁽⁷⁾.

Direnç genlerinin belirlenmesi: ACC MF, ACC MR, FOX MF, FOX MR, MOX MF, MOX MR, DHA MF, DHA MR, CIT MF, CIT MR, EBC MF, EBC MR primerleri kullanılarak literatürde tarif edildiği şekilde multipleks PZR uygulanmıştır⁽⁷⁾. Bu primerlerle hedeflenen gen bölgeleri; ACC (ACC1, ACC2), FOX (FOX1, FOX2, FOX3, FOX4, FOX5, FOX-5b), MOX (MOX1, MOX2, CMY1, CMY8, CMY9, CMY10, CMY11), DHA (DHA1-DHA2), CIT (LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, CMY2, CMY3, CMY4, CMY5, CMY6, CMY7, BIL1), EBC (ACT1, MIR1) şeklindedir. Elde edilen PZR örneklerine 0.5XTBE tamponu içinde etidyum bromid eklenmiş, % 2'lik (wt/vol) agaroz jele yüklenip, 100 voltta bir saat yürütülmüştür. Sonra UV transilluminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) altında görüntülenmiştir. Elde edilen bant paternleri, moleküler büyüklük belirteci (50 bç-1000 bç Bio Basic, Kanada) standart alınarak değerlendirilmiştir⁽⁷⁾. Elde edilen PZR ürünlerinin doğru gen bölgelerine karşılık gelip gelmediği incelenmiştir. Bu amaçla, her bir gen için pozitif bulunan birer suşa ait PZR ürünü; PZR amplifikasyo-

nunda kullanılan aynı primerler ile iki yönlü sekans analizine tabi tutulmuş ve elde edilen diziler, internet üzerinden BLAST programı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak GenBank üzerinde kayıtlı dizilerle karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu (GSBL pozitif, AmpC negatif) kullanılmıştır.

Fenotipik tarama testleri: ampC geni pozitif olarak belirlenen suşları, boronik asit ile fenotipik olarak değerlendirebilmek için AFB (Fluka,China) kullanılarak uygulanan ÇDST, IPDD ve Coudron'un geliştirdiği disk potansiyelizasyon testi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Yagi ve ark.'nın⁽⁹⁾ geliştirdiği ÇDST için 1 ml dimethyl sulfoxide (DMSO₄) içerisinde 50 mg AFB olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Kirby-Bauer diskleriyle aynı boyutlarda olan antibiyotik emdirilmemiş boş disklerin her birine hazırlanan çözeltilerden 300 µg emdirilmiş ve diskler 60 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra hemen kullanılmıştır. Kanlı agarda, nemli ortamda 37°C'da 18-24 saat inkübasyon sonrasında üreyen mikroorganizma kolonilerinden, Mueller-Hinton broth'ta 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve bu süspansiyon Mueller-Hinton agara yayılmıştır. Bakteri süspansiyonu yayılmış Mueller-Hinton agar plağının ortasına AFB emdirilmiş disk yerleştirilmiş ve bu diskin her iki yanına merkezden merkeze uzaklıkları 18 mm olacak şekilde 30 µg seftazidim (CAZ) ve 30 µg sefotaksim (CTX) diskleri konulmuştur. Plaklar bir gece boyunca 37°C'da inkübe edildikten sonra CAZ ve CTX etrafındaki inhibisyon zonunun AFB diskinde doğru genişlemesi AmpC tipi beta-laktamaz varlığı yönünde yorumlanmıştır⁽¹⁰⁾. Yine Yagi ve ark.'nın⁽⁹⁾ önerdiği IPDD için Mueller-Hinton broth'ta 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agara yayılmıştır. CAZ (30 µg) diskinde, hazırlanan AFB+DMSO₄ çözeltilerinden 300 µg emdirilmiştir. AFB emdirilmiş bu disk ile yalnızca 30 µg CAZ içeren disk merkezden merkeze uzaklıkları 30 mm olacak şekilde bakteri süspansiyonu yayılan Mueller-Hinton agar üzerine yerleştirilmiştir. Plaklar 37°C'da bir gece inkübe edilmiştir. Zon çapları karşılaştırıldığında aralarındaki fark ≥5 mm AFB emdirilmiş disk lehine ise AmpC tipi beta-laktamaz varlığı olarak yorumlanmıştır⁽¹⁰⁾. Coudron'un disk potansiyalizasyon testi yöntemine göre 120 mg AFB (Fluka, China), 3 ml DMSO₄ içinde çözündürülmüş ve bu

çözeltiye 3 ml steril distile su eklenmiştir. Bu çözeltiden 30 µg sefotetan (CTT) disklerine 20 µl emdirilmiş, diskler kuruması için 30 dakika beklendikten sonra hemen kullanılmıştır. CTT diskiyle, AFB eklenen CTT diski merkezden merkeze uzaklıkları 30 mm olacak şekilde, 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu yayılan Mueller-Hinton agar üzerine yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C'da bir gece inkübe edilip, CTT diski ve AFB emdirilmiş CTT diski etrafındaki zon çapları karşılaştırılmıştır. AFB emdirilmiş disk ≥ 5 mm geniş ise AmpC tipi betalaktamaz varlığı yönünde yorumlanmıştır ⁽⁸⁾. Negatif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşu (GSBL pozitif, AmpC negatif) kullanılmıştır.

BULGULAR

Hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında Eylül 2006-Şubat 2008 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (405 idrar, 95 yara, 21 apse, dokuz balgam, yedi kan, altı katater, altı mayi, üç treakeal aspirat, bir safra) izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesine ait toplam 553 suş çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen 553 suşun 46 (% 8.3)'sında sefoksitin inhibisyon zon çapı <18 mm saptanmıştır. Bu suşların tamamının seftazidime dirençli, sefepime ve imipeneme duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sefoksitin zon çapı <18 mm olan 46 suşun bakteri türlerine göre dağılımı ve GSBL oranları Tablo 1'de görülmektedir.

Kirby-Bauer disk difüzyon testinde sefoksitin zon

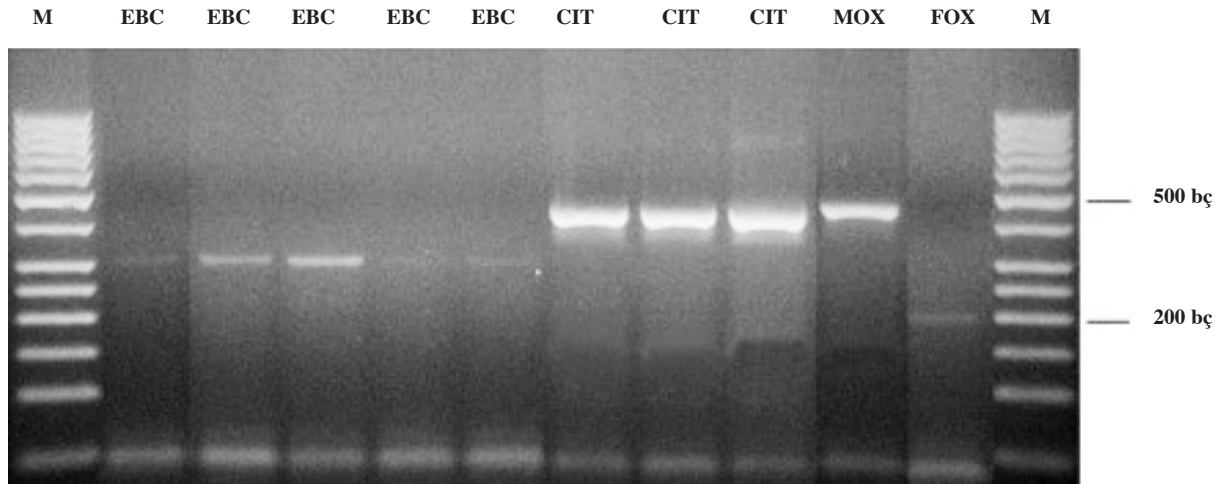
Tablo 1. Sefoksitin zon çapı <18 mm tespit edilen 46 suşun türlerine göre dağılımı ve GSBL oranları.

Tür	n (%)=	GSBL + (%)
<i>E. coli</i>	38 (82.6)	28 (73.7)
<i>K. pneumoniae</i>	6 (13)	4 (66.7)
<i>K. oxytoca</i>	2 (4.3)	1 (50)
Toplam	46	

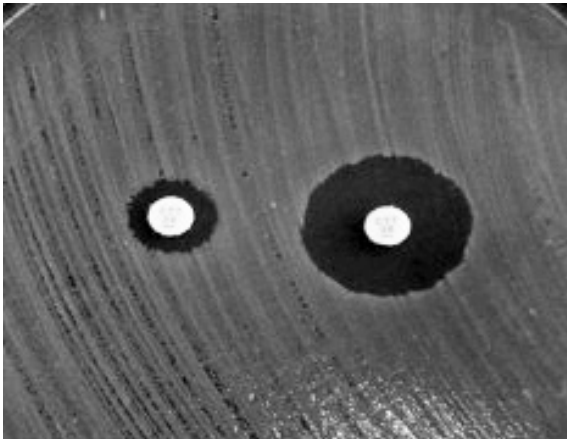
çapı <18 mm saptanan suşlar AmpC tipi betalaktamaz varlığı yönünden araştırılmak üzere ileri çalışmaya alınmıştır. Bu suşlarda öncelikle multipleks PZR yöntemi ile ampC genleri araştırılmıştır. ampC geni pozitif olarak belirlenen suşlara boronik asit ile ÇDST ve iki farklı yöntemle disk potansiyelizasyon testi uygulanmıştır ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Sefoksitin zon çapı <18 mm olan 46 suşun, 16'sının (% 34.8) ampC geni taşıdığı multipleks PZR ile gösterilmiştir. Bu suşların 14'ünün *E. coli* ve ikisinin ise *K. pneumoniae* olduğu saptanmıştır. On suşun EBC geni taşıdığı belirlenmiştir. EBC geni taşıyan suşların ikisinin *K. pneumoniae* ve sekizinin *E. coli* suşu olduğu belirlenmiştir. Bundan başka dört *E. coli* suşunun CIT, bir *E. coli* suşunun MOX, bir *E. coli* suşunun da FOX geni taşıdığı tespit edilmiştir. Resim 1'de PZR ile gen tespit edilen bazı suşların agaroz jeldeki görüntüleri sunulmuştur.

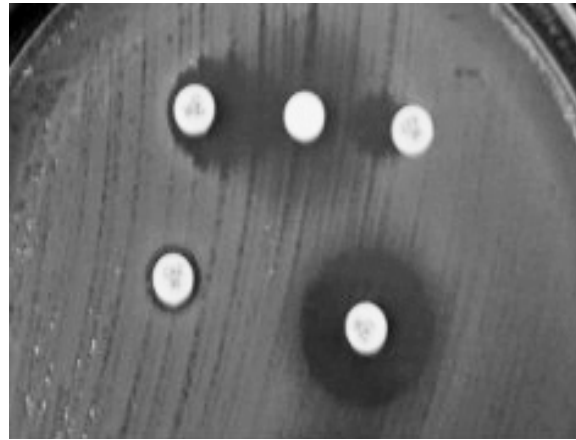
PZR ile gen taşıdığı gösterilen 16 suşun 13'ü her üç fenotipik testle pozitiflik verirken, biri IPDD ve Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ile ikisi ise



Resim 1. AmpC geni pozitif bazı suşların agaroz jel görüntüleri.



Resim 2. EBC geni taşıyan *E. coli* suşunun Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ile pozitifliği.



Resim 3. EBC geni taşıyan bir *E. coli* suşunun ÇDST ve IPDD testi ile pozitifliği.

Tablo 2. Boronik asitle inhibisyon testleri, GSBL ve PZR sonuçları.

Suş no	Örnek	Tür	ÇDST	IPDD	CDPT	Gen	GSBL	FOX	FEP	CAZ
3-I1	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	MOX	+	16	S	R
3-I2	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	16	S	R
4-B4	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	FOX	+	16	S	R
5-D9	yara	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	0	S	R
5E2	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	CIT	+	14	S	R
7-F8	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	16	S	R
B-9	kateter	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	EBC	+	13	S	R
C-19	yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	EBC	+	0	S	R
D-2	yara	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	15	S	R
D-22	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	9	S	R
204	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	CIT	+	0	S	R
21	idrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	EBC	+	13	S	R
15	yara	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	0	S	R
7	Trakeal aspirat	<i>E. coli</i>	+	+	+	EBC	+	13	S	R
50	idrar	<i>E. coli</i>	+	+	+	CIT	+	0	S	R
37	yara	<i>E. coli</i>	+	+	+	CIT	+	17	S	R

ÇDST: Çift disk sinerji testi, IPDD: İnhibitör-potansiyelizasyon disk difüzyon, CDPT: Coudron'un disk potansiyelizasyon testi, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, FOX: Sefoksitin, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim

yalnızca Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ile pozitif sonuç vermiştir. Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ampC geni pozitif 16 suşun tamamını pozitif olarak belirlerken, IPDD ile EBC geni taşıyan bir *K. pneumoniae* suşu hariç 15 suş pozitif bulunmuş, ÇDST testi ise EBC geni taşıyan iki *E. coli* ve bir *K. pneumoniae* suşu hariç 13 suşta pozitif sonuç vermiştir. Fenotipik test sonuçları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamış olmakla beraber, Coudron'un disk potansiyelizasyon yöntemi tüm suşları pozitif olarak tespit edebilen tek yöntem olmuştur. EBC geni taşıyan bir *E. coli* suşunun Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ile pozitifliği Resim 2'de, ÇDST ve IPDD yöntemleri ile pozitifliği de Resim 3'te gösterilmiştir.

ampC geni taşıdığı tespit edilen 16 suşun 11'inin (% 68.7) aynı zamanda GSBL de taşıdığı tespit edilmiştir. EBC pozitif 10 suşun yedisi (beş *E. coli*, iki *K. pneumoniae*), CIT pozitif dört suşun üçü (üç *E. coli*) ve FOX pozitif bir suşta (*E. coli*) GSBL de pozitif bulunmuştur.

ampC geni pozitif bulunan 16 suşun tamamının seftazidime dirençli, sefepim ve imipeneme duyarlı oldukları görülmüştür.

Tablo 2'de sefoksitin zon çapı <18 mm tespit edilen 16 suşun GSBL sonuçları, fenotipik boronik asit test sonuçları ve multipleks PZR gen sonuçları gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonları etkenleri içerisinde *Enterobacteriaceae* ailesi en sık izole edilen mikroorganizmalardır. Gram negatif bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirmesinde en önemli mekanizma beta-laktamaz üretimidir. Tüm dünyada sık rastlanan GSBL tipi beta-laktamazların yanı sıra AmpC tipi beta-laktamaz bildirimi de gittikçe artmaktadır^(12,13).

Moland ve ark.⁽¹³⁾, 2000 yılında 24 hastaneden topladıkları 1123 *K. pneumoniae* izolatı arasından seçilen hem imipenem hem de sefoksitin dirençli ya da orta duyarlı 408 izolatın, beta-laktamaz ürettiğini tespit etmiş ve bunların % 12.5'inde plazmid kökenli AmpC tipi enzim bulunduğunu, bu tip enzimlerin çalışmaya katılan merkezlerin % 42'sinde gösterildiğini bildirmiştir. Buna benzer çalışmalar artmakla birlikte ampC aracılı direnç prevalansı dünya çapında henüz tam olarak bilinmemektedir. Bunun nedeni AmpC tipi beta-laktamazı tanımlayacak pratik testlerin eksikliğidir⁽⁷⁾.

Perez-Perez ve Hanson⁽⁷⁾ tarafından gram negatif bakterilerde transfer edilebilen AmpC tipi beta-laktamaz genlerini tespiti kolaylaştırmak için tüm genlerin temsil edildiği bir multipleks PZR yöntemi tanımlanmıştır. Çalışmamızda bu yöntem uygulanmıştır. Bu yöntem plazmid kökenli ampC varlığını ve enzimin hangi aileden olduğunu belirleyebilen hızlı ve hassas bir yöntemdir.

Çalışmamızda sefoksitin zon çapı <18 mm olan 46 suş tespit edilmiş bunların 16'sının ampC geni taşıdığı multipleks PZR yöntemi ile gösterilmiştir. Bu suşların çoğunluğunun EBC (ACT-1, MIR-1) geni taşıdığı ve ampC geni tespit edilemeyen 30 suşta sefoksitine karşı meydana gelen direncin dış membran geçirgenliğinin azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamıza benzer olarak Coudron ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ 189 *K. pneumoniae* kan izolatı ile yaptıkları çalışmada, Alvarez ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ ABD'de 2004'te 752 dirençli ve plazmid kökenli ampC geni taşıyan izolat ile yaptığı çalışmada en sık ACT-1 ve FOX-5 belirlenmiştir.

Ülkemizde Bal ve ark.⁽¹⁶⁾, böbrek nakli yapılmış 14 hastada *K. pneumoniae* suşlarında plazmid kaynaklı CMY-2 enziminin varlığı bildirilmiştir. İstanbullu ve ark.'nın⁽¹⁷⁾ 2004 yılında yaptığı bir çalışmada ise, C1 grubu (blaCMY, blaAmpC, blaLAT, blaBIL), C2 grubu (blaCMY-1, blaFOX, blaMOX), C3 grubu (blaMIR, blaACT) gen bölgeleri PZR ile araştırılmış ve 29 *E. coli* izolatından üçünde ve 71 *K. pneumoniae* izolatının yedisinde pozitiflik belirlenmiştir.

Çalışmamızda sefoksitin zon çapı <18 mm tespit edilen 46 suşun 33'ünün (% 71.7) CLSI'ın önerdiği fenotipik doğrulama testiyle GSBL ürettiği tespit edilmiştir. Alvarez ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ yaptığı çalışmada, tüm AmpC tipi beta-laktamaz içeren suşların %11'inin SHV ve TEM tipi GSBL içerdiği bildirilmiştir. İstanbullu ve ark.⁽¹⁷⁾ plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamaz varlığı saptanan üç *E. coli* kökeninin ikisinde, yedi *K. pneumoniae* kökeninin ise üçünde ÇDST ile GSBL varlığı saptamıştır.

Plazmid kontrolündeki AmpC beta-laktamazlar rutin duyarlılık testlerinde yalancı duyarlı sonuçlara yol açabilmekte ve aynı GSBL'lerde olduğu gibi klinikte buna bağlı tedavi başarısızlıkları bildirilmektedir. GSBL tespiti için CLSI'ın önerdiği metotlar bulunmasına rağmen, AmpC tipi beta-laktamazları tespit edebilmek için CLSI'ın önerdiği laboratuvarlarda kolayca uygulanabilecek basit ve güvenilir testler bulunmamaktadır. AmpC tipi beta-laktamazların dünya çapında artan prevelansları düşünüldüğünde plazmid aracılı çoklu ilaç direnci oluşturmaları ve yayılmanın önlenmesi, enfeksiyonların kontrol altında tutulması açısından mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulaması kolay ve güvenilir testlere gereksinim vardır⁽¹²⁾. Bu nedenle birçok araştırmacı klinik laboratuvarlarda uygulanabilecek ucuz, pratik ve güvenilir testler geliştirmeye çalışmaktadır.

Yagi ve ark.⁽⁹⁾ 2005 yılında sınıf C beta-laktamazları tespit etmek için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla kullanılacak üç yeni metot geliştirdi. Bunlar; sınıf C beta-laktamaz spesifik inhibitörü boronik asit deriveleri kullanılarak uygulanan ÇDST, IPDD ve mikrodilüsyon testleridir. Bu metotlarla plazmid aracılı sınıf C beta-laktamaz üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarını, diğer sınıflardan beta-laktamazlar olan GSBL ve MBL üretenlerden kolaylıkla ayırt edilebildiğini açıklamışlardır. Bu

metotların hedeflenen antimikrobiyal terapi ve daha iyi enfeksiyon kontrolü için gerekli olan bilgileri sağlayabildiği belirtilmiştir ^(9,10).

Çalışmamızda multipleks PZR ile ampC geni tespit ettiğimiz 16 suştan, IPDD testi ile EBC geni taşıyan bir *K. pneumoniae* suşu hariç 15 suş pozitif bulunmuş, ÇDST testi ile de EBC geni taşıyan iki *E. coli* ve bir *K. pneumoniae* suşu hariç 13 suş pozitif sonuç vermiştir.

Coudron ⁽⁸⁾, sefotetan kullanarak yapılan boronik asit temelli bir testin plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz tespitini kolaylaştırdığını açıkladı. Coudron ⁽⁸⁾; meto-
dunda plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz ve GSKBL'yi aynı anda üreten suşları tespit edebildiğini açıklasa da her iki enzimin bir arada olduğu yalnızca üç suş test edebilmiştir. Coudron çalışmasına ⁽⁸⁾, sefoksitin zon çapı <18 mm olan izolatlara dahil etmiştir. Toplam 271 klinik izolatın 55'i PZR ile AmpC pozitif bulunmuş ve bunların 54'ü boronik asit disk testi ile tespit edilebilmiştir. Bu sonuçlara göre bu test yalnızca bir *P. mirabilis* izolatını tespit edememiş ve bu hatanın *Proteus*'un yayılma hareketine bağlı olabileceğini belirtilmiştir ⁽⁸⁾.

Çalışmamızda multipleks PZR ile gen taşıdığı belirlenen 16 suşun tamamında Coudron'un disk potansiyelizasyon testi ile pozitiflik tespit edilmiştir. Uyguladığımız diğer fenotipik test sonuçları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olmakla beraber P.E. Coudron'un geliştirdiği yöntem ampC geni taşıyan tüm suşları tespit edebilmiştir. Bu sonuçlarımız, Coudron'un disk potansiyelizasyon testi yönteminin, AmpC beta-laktamaz taramalarında oldukça güvenilir ve kolay uygulanabilecek bir yöntem olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada boronik asit bazlı testlerin plazmid veya kromozomal kaynaklı AmpC enzimlerini ayırt edemediği bildirilmektedir ⁽⁸⁾. Ancak, bizim çalışmamızda fenotipik olarak pozitif bulunan suşların tamamında PZR ile plazmid kökenli AmpC varlığı kanıtlanmıştır.

Coudron ve ark. ⁽¹⁴⁾ sefoksitin duyarlılığı azalmış 271 suşun 55'inde ampC geni varlığını göstermişler ve bunların 54'ünü (13 *Klebsiella*, 38 *E. coli* ve 3 *P. mirabilis*) boronik asitli disk testiyle pozitif bulmuş ve bu testi tarama testi olarak önermişlerdir. Black ve ark. ⁽¹⁸⁾ ise boronik asit tarama testiyle pozitif bulunan

31 suşun 18'inde ampC geni göstermiş ve bunun ampC gen çeşitliliğindeki artıştan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Kan kültürlerinde AmpC tipi beta-laktamaz üreten *K. pneumoniae* ile enfekte hastalar arasında yapılan bir çalışmada özellikle sefalosporin tedavisinden sonra yüksek oranda klinik başarısızlık bildirilmiştir ⁽¹⁹⁾. Açıkça görülmektedir ki AmpC tipi beta-laktamaz içeren mikroorganizmaları tespit etmek klinikteki tedavi başarısına önemli katkılar sağlamaktadır ⁽²⁰⁾.

Bazı çalışmalarda AmpC beta-laktamaz enziminin saptanmasında inhibisyon temelli disk difüzyon ya da mikrodilüsyon yöntemlerinin non-spesifik olabileceği bulunmuş ve yeni yöntemlerin araştırılması, var olan testlerinse rutin laboratuvarlarda kullanımının kolay hale getirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür ^(9,10,20).

CLSI kılavuzlarında AmpC tipi beta-laktamazların tanımlanması için önerilmiş bir test yoktur. Son zamanlarda AmpC tipi beta-laktamazlarla ilgili çalışmalar artmış olsa da bu enzimlerin klinik laboratuvarlarda tanımlanması ve yayılımının kontrolü ile ilgili sorunlar bulunmaktadır. Var olan enzim tiplerinin daha da yayılmasının ve yeni enzimlerin evrimleşmesinin engellenmesi için ampC ekspresyonunu etkileyen tüm genetik ve çevresel faktörlerin anlaşılması, rutin laboratuvarlarda kullanılacak standart tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesi, bu enzimlerin hastanede ve toplumda yaygınlığının bilinmesi, tedavide kullanılacak etkili inhibitörlerin geliştirilmesi gereklidir ⁽²¹⁾.

Sonuç olarak, plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamazlar hızlı yayıldıkları, rutin duyarlılık testlerinde tanımlanamadıkları ve tedavide başarısızlığa yol açtıkları için surveyanslarının yapılması gereklidir. Bu genlerin tespitinde en güvenilir yöntem PZR analizi olmakla birlikte rutin laboratuvarlarda kullanılacak fenotipik tarama testlerine gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamızda fenotipik üç test karşılaştırılmış ve PZR ile en uyumlu sonuçları veren Coudron disk potansiyelizasyon testinin AmpC beta-laktamaz taramalarında rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek kolay, ekonomik ve güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Pool K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2200-23. PMID:15338052
2. Gülay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D eds. Önemli ve sorunlu gram negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 95-109. PMID:11751104 PMCID:126993
3. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid determined AmpC type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1-11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002> PMID:19995920 PMCID:2825993
4. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-76. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
5. Nasim K, Elsayed S, Pitout JDD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2004; 12:4779-802.
6. Akova M. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar ve klinik önemi. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D eds. Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 85-95. PMID:12037080 PMCID:130804
7. Perez-Perez J, Hanson ND. Detection of plasmid mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2153-62. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002> PMID:16081966 PMCID:1233913
8. Coudron PE. Inhibitor-base methods for detection of plasmid mediated AmpC type beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4163-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.4163-4167.2005> PMID:15956362 PMCID:1151917
9. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2551-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.6.2551-2558.2005> PMID:20395214
10. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1319-21. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq124>
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. On sekizinci Bilgi Eki, M100-S18. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2008. PMID:17339123
12. Yohei D, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *International Journal of Infectious Diseases* 2007; 11:191-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2006.07.008> PMID:12435685 PMCID:132764
13. Moland SE, Black JA, Ourado J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3837-42. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.12.3837-3842.2002> PMID:12574281 PMCID:149714
14. 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; 41:772-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.772-777.2003> PMID:14742206 PMCID:321551
15. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid mediated AmpC type beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:533-7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.2.533-537.2004> PMID:16000421 PMCID:1169113
16. Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE, Ang Ö. Çoğul dirençli K. pneumoniae suşlarında plazmidik sefamisinaz CMY-2. *İnfeksiyon Dergisi* 1995; 9:67.
17. İstanbullu A, Midilli K, Aysu G. Hastanemizdeki izole edilen *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinin plazmid kökenli AmpC tipi beta-laktamaz varlığı yönünden araştırılması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, 19-23 Eylül 2004, Kuşadası: Türkiye. Sayfa 66.
18. 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; 43:3110-3. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3110-3113.2005> PMID:19036936 PMCID:2643671
19. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *J Clin Microbiol* 2009; 47:294-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01797-08> PMID:15388426 PMCID:521917
20. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB. Epidemiology and clinical features of bloodstream infection caused by AmpC type beta-lactamase producing *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3720-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.10.3720-3728.2004> PMID:12775673
21. Hanson ND. AmpC beta-lactamases: What do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:2-4. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg284>