Escherichia coli ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Plazmid Kaynaklı AmpC Beta-Laktamaz Üretiminin Araştırılması

Detection of Plasmid-Mediated AmpC Beta-Lactamase Production in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates

Hilal BALIKÇI¹, Z. Cibali AÇIKGÖZ², Selda GÜVENMAN³, Nevreste ÇELİKBİLEK², Birsen ÖZDEM²

¹ Beyşehir Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.

¹ Beyşehir State Hospital, Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.

² Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

² Ankara Atatürk Education and Research Hospital, Medical Microbiology Clinic, Ankara, Turkey.

³ Kars Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kars.

³ Kars State Hospital, Microbiology Laboratory, Kars, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.09.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.01.2014

ÖZET

Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarındaki plazmid aracı AmpC (pAmpC) prevalansı; pAmpC tespitinde kullanılan fenotipik testlerin etkinliği ve pAmpC enzimlerini kodlayan *ampC* genlerinin türlerine ilişkin veri toplanması hedeflenmiştir. Laboratuvarımıza, 2008-2011 tarihleri arasında gönderilen; poliklinik, servis ve yoğun bakım hastalarına ait klinik örneklerden üretilen 1030'u *E.coli*, 286'sı *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 1316 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlara, öncelikle Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testleri uygulanmış; bu testlerde sefoksitine (FOX) dirençli bulunan 36 (%2.7) izolat (%77'si *E.coli*, %23'ü *K.pneumoniae*); Boronik Asit İnhibisyon Testi (BAİT), Sefoksitin Hodge Testi (SHT) ve AmpC Disk Testi (ACDT) ile; pAmpC varlığı, fenotipik olarak araştırılmıştır. FOX duyarlı ancak üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli (S3R) 165 izolat (%88'i *E.coli*, %12'si *K.pneumoniae*) ise; olası ACC tipi pAmpC varlığı, inhibitörlü ve inhibitörsüz sinerji testleriyle, yine fenotipik olarak araştırılmıştır. Fenotipik testlerden en az biri ile pAmpC pozitifliği saptanan izolatlar, olası pAmpC enzimlerini kodlayan genlerin varlığını göstermek amacıyla multiplex PCR uygulanmıştır. FOX dirençli 36 izolatın 21 (%58)'inde SHT, 18 (%50)'inde ACDT, 6 (%17)'sında BAİT pozitif bulunmuştur. Fenotipik olarak pAmpC şüpheli 36 izolatın sadece 10 (%27.7, tümü *E.coli*)'unda PCR ile *pAmpC* gen varlığı saptanmış ve bu izolatlarda üretilen enzimin CMY-2 tipinde olduğu belirlenmiştir. PCR sonuçları dikkate alınarak karşılaştırma yapıldığında; BAİT, ACDT ve SHT'nin özgüllükleri sırasıyla

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Hilal Balıkçı, Beyşehir Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 42700 Beyşehir, Konya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 332 512 4949, **E-posta (E-mail):** vet_hilal@myynet.com

%97, %69, %58; duyarlılıkları ise %50, %100 ve %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, taramanın yapıldığı dönemde *pAmpC* prevalansı %0.8 (10/1316) olup, ilk *pAmpC* izolasyonu 2010 yılında gerçekleşmiştir. Sonuç olarak taradığımız popülasyonda *pAmpC* kaynaklı direnç henüz önemli bir sorun değildir. Ancak söz konusu direncin, 2010 yılından itibaren ortaya çıkmış olması; önlem alınması durumunda yaygınlaşacağına işaretidir. Mevcut hiçbir fenotipik testin tek başına *pAmpC* tespitinde yeterli olmadığı; BAIT'nin özgüllük, diğer testlerin duyarlılık açısından üstün oldukları ve *pAmpC* tarama-doğrulaması için bu testlerin birlikte kullanılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp.; *AmpC*; beta-laktamaz; plazmid; boronik asit.

ABSTRACT

This study was conducted to obtain data about prevalence of plasmid-mediated *AmpC* (*pAmpC*), efficacy of various phenotypic tests applied for the detection of *pAmpC*-mediated resistance and the enzyme types responsible for this resistance. A total of 1316 isolates (1030 *Escherichia coli* and 286 *Klebsiella* spp.) obtained from the clinical samples sent to our laboratory between 2008-2011 period, from various inpatient and outpatient clinics and intensive care units, were included in this study. Antimicrobial susceptibility profiles of the isolates were determined by using Kirby-Bauer disk diffusion method. Production of *pAmpC* was phenotypically investigated by Boronic Acid Inhibition Test (BAIT), Cefoxitin Hodge Test (CHT) and *AmpC* Disk Test (ACDT) in a total of 36 (2.7%) cefoxitin-resistant isolates (77% were *E.coli*, 23% were *K.pneumoniae*); and by synergy tests with or without *AmpC* inhibitors in a total of 165 (88% were *E.coli*, 12% were *K.pneumoniae*) cefoxitin-susceptible, third generation cephalosporin-resistant (S3R) isolates. For the detection of *pAmpC* genes a multiplex-PCR protocol was applied to the isolates found positive at least by one of the phenotypic tests. CHT, ACDT and BAIT were found positive in 21 (58%), 18 (50%) and 7 (19%) of the 36 cefoxitin-resistant isolates, respectively. In only 10 (27.7%) of these isolates (all were *E.coli* strains), *pAmpC* presence was detected by PCR; and the enzyme produced was assessed as CMY-2. Based on the positive PCR results; specificity rates of the phenotypic tests, BAIT, ACDT and CHT were 97%, 69% and 58%; while the sensitivity rates were 50%, 100% and 100%, respectively. Our data indicated that, *pAmpC* prevalence (10/1316, 0.8%) detected in this study, did not seem to be an important problem yet, in the population screened. However, since the first detection of this resistance was in 2010, it should be considered as a sign to get necessary precautions preventing its spread. In conclusion, none of the phenotypic methods were satisfactory alone for the detection of *pAmpC*-mediated resistance; and BAIT was superior in terms of specificity while the others were superior in terms of sensitivity. Thus, combined application of these phenotypic tests are necessary to screen and confirm the presence of *pAmpC*-mediated resistance.

Key words: *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp.; *AmpC*; beta-lactamase; plasmid; boronic acid.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesi üyeleri, gerek hastane gerekse toplum kökenli enfeksiyonların önemli etkenlerinden olup, sahip oldukları genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri ile, antibiyotik direnç oranlarında ve buna paralel olarak morbidite, mortalite ve sağlık harcamalarında artışa neden olmaktadır¹. GSBL enzimlerinin yanı sıra, giderek artan oranlarda saptanan plazmid kökenli *AmpC* beta-laktamaz (*pAmpC*)'lar da *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarında önemli bir direnç sorunu olarak ortaya çıkmaktadır². Gerek GSBL, gerekse *pAmpC* enzimleri, büyük plazmidler ile aktarıldıkları için çoklu ilaç direncine neden olurlar ve bakteriler arasında kolayca yayılabilirler. Bu nedenle, GSBL ve *pAmpC* içeren izolatlarla meydana gelen enfeksiyonlarda tedavi seçe-

nekleri oldukça kısıtlıdır. pAmpC kaynaklı dirençte sefamisinlere karşı da direnç mevcut olduğundan; bu enzimlerin klinik önemleri GSBL'lere göre daha da fazladır³. pAmpC varlığında izolatlar; penisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamlara dirençlidirler. pAmpC'lere bugüne kadar, başta *Klebsiella* spp. olmak üzere *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. ve *E.coli*'de rastlanmıştır. Öte yandan *E.coli*'de zaman zaman aşırı üretimi söz konusu olan kromozomal AmpC (kAmpC) enzimi de bulunmaktadır^{4,5}.

pAmpC'ler arasında ACC türü enzimler, sefamisinlere duyarlı olmaları ile diğer türlerden ayrılan bir grup oluştururlar. Bu gruptan ilk enzim olan ACC-1, 1999 yılında Almanya'da rapor edilmiş; araştırmalar, bu enzimin *Hafnia alvei*'den köken aldığını göstermiştir⁶. ACC-1'e şimdiye kadar Almanya, İspanya ve Tunus'ta rastlanmıştır. ACC türü enzim üretimine *Salmonella enterica* serotiplerinde, *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *P.mirabilis*'de rastlanmaktadır⁷.

CLSI ve EUCAST rehberlerinde, henüz pAmpC tespitine yönelik, onaylanmış bir tarama ve doğrulama testi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar ışığında, bazı fenotipik testlerin bu amaçla kullanılabileceği öngörülmekle birlikte, henüz fenotipik testler, pAmpC varlığını tek başına saptayabilecek standardizasyona sahip değildirler⁸. pAmpC saptanmasında bazı araştırmacılar tarafından altın standart kabul edilen yöntem halen multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir⁹. Ancak PCR, ulaşılabilirlik ve laboratuvar olanakları düşünüldüğünde yeterince pratik ve ucuz değildir. Bu nedenle rutin laboratuvar koşullarında uygulanabilecek, standardize fenotipik yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, hastanemizden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerindeki pAmpC prevalansı, pAmpC tespitinde kullanılan fenotipik testlerin etkinliği ve dirençten sorumlu *ampC* genlerinin türlerine ilişkin veri toplanması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya, Ocak 2008-Kasım 2011 tarihleri arasında poliklinik, servis ve yoğun bakım hastalarından toplanmış klinik örneklerden (822 idrar, 89 kan, 65 alt solunum yolu, 41 yara, 13 apse) izole edilen 1030 *E.coli* ve 286 *Klebsiella* spp. (268 *K.pneumoniae*, 18 *K.oxytoca*) izolatu dahil edildi. Bu izolatlar arasından Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmış rutin antibiyogram testlerinde sefoksitin (FOX) dirençli bulunan 36 izolat (%2.7) ve FOX duyarlı olduğu halde üçüncü kuşak sefalosporin direnci saptanmış (S3R) olanlardan rastgele seçilen 165'i; pAmpC açısından incelenmek üzere ileri araştırma testlerine alındı. S3R izolatların tamamı, CLSI kriterlerine göre, çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitif olarak rapor edilmiş izolatlardı.

FOX Dirençli İzolatlarda pAmpC Ekspresyonunun Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Boronik Asit İnhibisyon Testi (BAİT): 120 mg aminofenil-boronik asit (APB) (Sigma, Aldrich), 3 ml dimetilsülfoksit (DMS) (Merck) içinde çözülüp üzerine 3 ml distile su eklenerek hazırlanan APB solüsyonundan 20'şer µl, 30 µg FOX içeren disklerle emdi-

rildi¹⁰. BAİT için FOX dirençli izolatlar, dönemin geçerli CLSI önerilerine uygun olarak, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle, FOX ve APB + FOX içeren iki disk ile hazırlanan antibiyogram düzeneğinde test edildi. 37°C’de bir gecelik inkübasyon sonrasında, AFB + FOX diskindeki zon çapı genişlemesi incelendi. FOX + AFB diskinde FOX diskine göre ≥ 5 mm’den daha geniş zon çapına sahip izolatlar pAmpC açısından pozitif, zon çapı genişlemesi 0-4 mm olan izolatlar da negatif olarak değerlendirildi¹⁰.

Sefoksitin Hodge Test (SHT): *E.coli* ATCC 25922 standart suşunun 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonu Mueller-Hinton agara homojen olarak inoküle edildi. Plağın merkezine FOX diski yerleştirildi. Şüpheli izolatlardan alınan kolonilerden, öze yardımıyla çevreden disk sınırına doğru bir hat boyunca yoğun, tek hat çizgi ekimleri yapıldı. Test edilen bakterinin FOX inhibisyon zonunda disk merkezine doğru bir girinti (*indentation*) oluşturması ve bu girintinin negatif kontroldekinden daha fazla olması durumunda, test sonucu pozitif kabul edildi^{7,11}. Testte negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 ve *K.pneumoniae* ATCC 700603; pozitif kontrol olarak da *C.freundii* ATCC 8090 standart suşları kullanıldı.

AmpC Disk Testi (ACDT): *E.coli* ATCC 25922 standart suşunun 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonu Mueller-Hinton agara homojen olarak inoküle edildi. Plak merkezine FOX diski yerleştirildi. FOX diskinin hemen bitişiğine, diske değecek şekilde, üç yönde, 100XTris-EDTA emdirilmiş üç disk yerleştirildi. Disklerden birinin üzerine, test izolatı kolonilerinden birkaç tanesi öze yardımıyla sürüldü. Diğer iki diske, negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 ve *K.pneumoniae* ATCC 700603, pozitif kontrol olarak da *C.freundii* ATCC 8090 standart suşları sürüldü. Bir gecelik inkübasyon sonrası FOX diski zonunda düzleşme ya da disk merkezine doğru girinti oluşumu durumunda test pozitif kabul edildi¹².

FOX Duyarlı S3R İzolatlarda ACC türü pAmpC Varlığının Araştırılması

Yukarıda formülü verilen APB solüsyonundan 20’şer µl; 30 µg amoksisilin-klavulanat (AMC) içeren disklerle ve boş, steril antibiyotik disklerine; final disk içeriği 400 µg/ml olacak şekilde emdirildi¹⁰. ACC türü enzim taşıyan izolatların FOX duyarlı, sefotetana (CTT) kısmi dirençli ve S3R olacağı beklentisinden hareketle; sefpodoksim (CPD), sefotaksim (CTX), FOX, CTT, AMC ve AMC + APB diskleriyle bir antibiyogram düzeneği hazırlandı¹⁰. Pozitif kontrol olarak yurt dışından temin edilen ve ACC-1 ve ACC-4 olduğu belirtilen 2 *E.coli* izolatı kullanıldı. 165 FOX duyarlı, S3R ve GSBL pozitif izolatta olası ACC tipi pAmpC varlığını araştırmak amacıyla, FOX ile CTX arasında sinerji varlığı, FOX zon çapı ile CTT zon çapı arasında fark olup olmadığı, CTX ile AMC + AFB arasındaki yardımlaşma zonu çapının, CTX ile AMC arasındaki yardımlaşma zonu çapından; CPD ile AMC + AFB arasındaki yardımlaşma zonu çapının, CPD ile AMC arasındaki yardımlaşma zonu çapından büyük olup olmadığı incelendi^{8,10}. Bu düzenekte AMC’nin, AmpC saptanmasını maskeleyen GSBL’yi inhibe edip pAmpC’nin fenotipik olarak gözlenebilecek hale gelmesini sağlaması amaçlandı. Test düzeneği Şekil 1’de gösterildi.

Şekil 1. Sefoksitine duyarlı, S3R izolatlarda olası ACC türü *pAmpC* varlığının araştırmasında kullanılan test düzeneği.

***pAmpC* Gen Varlığının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması**

FOX dirençli 36 izolat, *pAmpC* gen varlığını araştırmak amacıyla Perez ve Hanson'un¹³ tanımladığı multipleks PCR ile test edildi. Bu amaçla altı *ampC* gen grubuna komplementer alt primer çifti ve internal amplifikasyon kontrolü için bir 16S rRNA primer çifti seçildi (Tablo I)¹³. Nükleik asit izolasyonu için QuiAmp DNA mini kit (Qiagen, Germany) kullanıldı. İzolasyon işlemleri, EMB agarda üreyen 3-4 koloni kullanılarak, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Amplifikasyon protokolü; 96°C'de 10 dk. ilk denatürasyon (hot start polimeraz kullanıldı); 96°C'de 30 sn, 64°C'de 30 sn, 72°C'de 60 sn olmak üzere 30 döngü ve 72°C'de 3 dk. son çoğaltma şeklindeydi (Chorbet Research, Australia). Amplikonlar, etidyum bromür ile boyanmış %2'lik agaroz jelde; 100-3000 bp'lık DNA büyüklük belirteci eşliğinde, 1 saat süreyle yürütüldü ve UV görüntüleme sisteminde (Dolphin View, ABD) incelendi. ACC pozitifliğinden kuşku edilen izolatlar da aynı protokolle multipleks PCR'ye tabi tutuldu. Pozitif kontrol olarak Dr. Şener'in (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara) sağladığı CMY-2 (*E.coli*) ve ACT-1 (*K.pneumoniae*) pozitif suşlar ve yurt dışından sağlanan sırasıyla ACC-1, ACC-4 pozitif birer *E.coli* suşu kullanıldı.

Tablo 1. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Çiftleri¹³

Primer	Hedef	Gen	Amplikon boyutu (bp)*	Primer baz dizisi
CIT	LAT1-4 CMY2-7 BIL1	<i>bla</i>	462	F: TGGCCAGAACTGACAGGCCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC
FOX	FOX1-5, FOX5B	<i>bla</i>	190	F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG
DHA	DHA1, DHA2	<i>bla</i>	405	F: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC
MOX	CMY1,8,9, 10,11 MOX1,2	<i>bla</i>	520	F: GCTGCTCAAGGAGCAGAGGAT R: CACATTGACATAGGTGTGGTGC
EBC	ACT1, MIR1	<i>bla</i>	302	F: TCGGTAAGCCGATGTTGCCG R: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT
ACC	ACC1, ACC2	<i>bla</i>	346	F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC
16S RRNA		<i>rRNA</i>		F: GAGGAAGGTGGGGATCAGGT R: AGGCCCCGGAACGTATTCAC

* bp: Baz çifti.

BULGULAR

Çalışmamızda, FOX diski (30 µg) ile taranan 1030 *E.coli* izolatının 28 (%2.7)'inde ve 286 *Klebsiella* spp.'nin 8 (%2.8)'inde olmak üzere toplam 36 (%2.7) izolatta FOX dirençli saptanmıştır. FOX dirençli izolatlardan %77 (28/36)'sinin *E.coli*, %23 (8/36)'ünün *K.pneumoniae* olduğu izlenmiştir. FOX dirençli izolatların 21 (%58)'i SHT, 18 (%50)'i ACDT ve 7 (%19)'si BAİT pozitifdir.

Multipleks PCR ile 1030 *E.coli* izolatının 10 (%1)'unda *pAmpC* genleri saptanırken, 286 *Klebsiella* spp. suşunun hiçbirisinde gen varlığı bulunmamış; tüm izolatlar için *pAmpC* gen pozitifliği %0.8 olarak gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen FOX dirençli izolatların 10'unda (tümü *E.coli*) (%27.7) CMY-2 türü *pAmpC* tespit edilmiştir. Yapılan ilk testlerde CMY-2 bandı görünen izolatlarda aynı zamanda, FOX geninin yaklaşık bant aralığına denk gelen ilave bir bant gözlenmesine rağmen, tek başına FOX primeri, tek başına CIT primeri ve FOX + CIT primeri eklenerek tekrarlanan PCR reaksiyonlarında bu banda rastlanmamıştır. Bu durumda ilk reaksiyonlarda gözlenen FOX ile uyumlu bantların özgül olmayan bantlar olduğu düşünülmüştür (Şekil 2 ve 3).

Gen varlığı saptanan izolatların tümü (%100) SHT ve ACDT, yarısı (%50) ise BAİT pozitif olarak bulunmuştur. Gen varlığı saptanmayan izolatların %42'sinde (*E.coli* izolatlarının %44'ü, *Klebsiella* spp. izolatlarının %38'i) SHT; %30'unda (*E.coli* izolatlarının %33'ü, *K.pneumoniae* izolatlarının %25'i) ACDT; %3.8'inde ise BAİT yanlış pozitif sonuç vermiştir. FOX duyarlı, S3R olan 165 izolatın (%88'i *E.coli*, %12'si *K.pneumoniae*) 16 (%9.7)'si fenotipik olarak ACC şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Bunların 1'inde

Şekil 2. *pAmpC* geni pozitif hastalar ve kontroller [M: DNA belirteci; Hat 1-10: CMY-2 pozitif klinik izolatlar; K1: CMY-2 pozitif kontrol (*E.coli*); K2: ACT-1 pozitif kontrol (*K.pneumoniae*); K3: ACT-1 pozitif kontrol (*E.coli*); K4: Negatif kontrol].

Şekil 3. *pAmpC* geni pozitif hastalar ve kontroller [1.GRUP: Sadece CIT primeri içeren amplikonlar; 2.GRUP: Sadece FOX primeri içeren amplikonlar; 3.GRUP: CIT ve FOX primerlerini içeren amplikonlar; M: DNA belirteci; Hat 1 ve 2: Pozitif klinik izolatlar; K1: CMY-2 pozitif kontrol; K2: CMY-2 pozitif kontrol; K4: Negatif kontrol].

FOX-CTX; 5'inde CTX-AMC + AFB; 5'inde CPD-AMC + AFB sinerjisi; 5'inde ise son iki kombinasyon sinerjisi birlikte saptanmıştır. Ancak hiçbirinde genotipik olarak *pAmpC* varlığı gösterilememiştir. Öte yandan pozitif kontrol olarak kullanılan ACC suşlarında da amplifikasyon gerçekleşmemiştir.

Sefoksitine duyarlı olan ACC türü enzim saptayabilme ihtimalini göz önünde bulundurarak, çalışmamıza eklediğimiz FOX duyarlı, S3R izolatlarla yapılan testlerde kullanılan pozitif kontrollerde, literatürde belirtilen FOX zon çapının CTT zon çapından daha geniş olması ve FOX ile aztreonam arasındaki sinerji varlığı gözlenememiştir. Çalışılan FOX duyarlı S3R izolatların 16 (%9.7)'sında farklı sinerji profilleri belirlenmiştir. Bir izolatta FOX-CTX sinerjisi; 5 izolatta BA ile CPD-AMC sinerjisinde artış; 5 izolatta BA ile CTX-AMC sinerjisinde artış; 5 izolatta da BA ile hem CPD-AMC, hem de CTX-AMC sinerjisinde artış izlenmiştir. Fenotipik olarak BA ile bariz sinerji artışı gözlenen ve multipleks PCR'ye tabi tutulan izolatların hiçbirinde *pAmpC* geni varlığı gösterilememiştir.

FOX dirençli *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının yıllara göre dağılımı incelendiğinde; pAmpC geni saptanan 10 izolattan 8 (%80)'inin 2010 yılında izole edildiği, 2011 yılına ait ise sadece iki izolatin olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde pAmpC beta-laktamaz tespiti için kullanılabilecek fenotipik tarama testlerinden uygulanabilirlik ve ulaşılabilirlik bakımından en basiti sefoksitin (FOX) direncidir. Ancak tek başına FOX direnci; porin kaybı veya kAmpC enziminin aşırı üretimi gibi mekanizmaları ayırt etmeye yeterli değildir^{10,14-16}. Nitekim çalışmamızda FOX dirençli bulunan 36 izolattan ancak 10'unda pAmpC geni saptanmıştır. Gen varlığı saptanmayan izolatların hepsinin *E.coli* olması, mevcut FOX direncinin kAmpC aşırı üretimine bağlı olabileceğini de düşündürmektedir. Öte yandan; ACC gibi, FOX'a duyarlılık gösteren enzimler söz konusu olduğunda pAmpC varlığı gözden kaçabilir.

Tarama amacıyla kullanılabilecek diğer bir pAmpC testi de sefoksitin Hodge testi (SHT)'dir. Lee ve arkadaşlarının⁷ SHT'yi dizi analiziyle karşılaştırdıkları çalışmada, bu testin, CMY-10 tipi pAmpC üreten izolatların tamamını, ancak, örneğin DHA-1 tipi enzimlerin sadece %57.3'ünü saptayabildiği bildirilmiştir. Ulusan ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, *K.pneumoniae* izolatlarından 10'u SHT ile pozitif bulunmuş, pozitif suşlardan hiçbirinde moleküler yöntemlerle pAmpC beta-laktamaz saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda FOX dirençli 36 izolata SHT uygulanmış; pAmpC geni pozitif izolatların tamamında SHT pozitif; negatif 26 izolatın 11 (%30.5)'inde ise yanlış pozitif sonuç alınmıştır. Bizim izolatlarımızda CMY-2 dışındaki enzim tipleri bulunmadığı için SHT'nin bu enzimlere ilişkin etkinliğine dair bir yorum yapılamamıştır. Bizim sonuçlarımız SHT'nin duyarlı, ancak özgüllüğü sınırlı bir test olduğuna işaret etmektedir.

AmpC disk testi (ACDT), ilk kez Black ve arkadaşları¹² tarafından geliştirilmiş ve çalışılan izolatlarda pAmpC varlığını yüksek oranda (42/44) saptayabilen bu yöntemin basit ve kullanışlı bir fenotipik test olduğu ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, ACDT'nin rutin çalışmalarda kullanılabilecek pratik bir yöntem olduğu ve duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu (> %90) vurgulanmaktadır^{18,19}. Bizim çalışmamızda ACDT, PCR ile CMY-2 pozitif olduğunu gösterdiğimiz 10 izolatın tamamında pozitif bulunmuş; ancak direnç geni negatif izolatlarda %22.2 gibi yüksek bir oranda yanlış pozitif sonuç vermiştir.

ACDT'nin geliştirilmesinden sonra, pAmpC tespiti için inhibitör bazlı testler tanımlanmış ve bu testlerde beta-laktam yapısındaki çeşitli inhibitör maddelerin denenmesine karşın, en iyi sonuca %100 özgüllük ve %91 duyarlılık ile sefotetan-Syn190 kombinasyonu ile varılmıştır⁹. pAmpC inhibitörü olarak araştırılan diğer maddeler ise boronik asit (BA) bileşikler olup, bunlar içinde de en fazla kabul göreni, 300 µg dozunda antibakteriyel etkisinin olmamasından dolayı aminofenil-BA (APB)'dir²⁰. FOX dirençli izolatlarla yapılan BA inhibisyon testinde, substrat olarak sefotaksim, seftazidim, sefotetan, sefoksitin ya da sefpodoksım kullanılmakta ve sefalosporin direnç zonunda 5 mm'den fazla zon çapı artışı pozitif sonuç olarak kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızda uygulanan BA inhibisyon testi (BAİT)'nde de, BA bileşiği olarak APB, sefalosporin olarak da FOX kullanılmış ve

oluşan zon çapı artışının gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Ancak, *pAmpC* geni saptanabilen 10 izolatın sadece yarısında BA ile zon genişlemesi belirlenmiş ve sonuçların %50 yanlış negatiflik yönünde olduğu izlenmiştir. Ayrıca, PCR ile *pAmpC* taşımadığı saptanan 26 izolata yapılan BAİT sonuçlarına göre de, bir *Klebsiella* spp. izolatında (%3.8) yanlış pozitiflik saptanmıştır. Bu sonuçlar BAİT'nin duyarlılığının diğer fenotipik testlere göre zayıf; ancak özgülüğünün bir hayli yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, BAİT'yi yüksek duyarlı olarak bildiren çalışmaların¹⁹⁻²¹ sonuçlarıyla uyumlu değildir. Coşkun ve Altanlar'ın²² çalışmasında ise, sefoksitine dirençli 50 *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatında *pAmpC* varlığının araştırılmasında boronik asit-klavulanik asit ile inhibisyon testi kullanılmış; 25 izolatta inhibisyon testi ile AmpC pozitifliği saptanmış, bunların da 22'sinde multipleks PCR ile pozitif sonuç alınmıştır. Bu araştırmacılar, inhibisyon testinde benzenboronik asit kullanımı ile daha fazla pozitif sonuç aldıklarını ve ayrıca testin uygulamasında, GSBL'lerin AmpC beta-laktamazları maskeleyerek yanlış sonuç vermesini önlemek için, klavulanik asit eklenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir²².

Brenwald ve arkadaşları¹⁰, FOX duyarlı, S3R olan GSBL pozitif izolatlarda ACC türü *pAmpC* saptanmasında FOX, CPD, CPD + AMC disklerini tek başlarına ve BA ile birlikte kullanmışlar ve *pAmpC* saptanmasında en iyi sonucu CPD + AMC + BA ile almışlardır. Bizim çalışmamızda da, bu çalışmanın sonuçları esas alınarak, elimizdeki izolatlarla Şekil 1'de gösterilen test düzeneği hazırlanmıştır. Fenotipik olarak BA ile belirgin sinerji artışı gözlenen izolatlar; ACC tipinde *pAmpC* varlığı açısından şüpheli kabul edilerek multipleks PCR'ye tabi tutulmuştur. Ancak bu izolatların hiçbirinde *pAmpC* geni varlığı gösterilememiştir. Diğer taraftan, Miro'dan²³ edindiğimiz ve ACC pozitif olduğunu kabul ettiğimiz suşta da PCR sonucu negatif bulunmuştur. Çelişik gibi görünen bu sonuçlar için olası açıklamalar şu şekilde sıralanabilir: (1) Fenotipik test sonuçları doğrudur; ACC primerleri çalışmamıştır. (2) Bizim çalışmamızda kullandığımız primer çifti; pozitif kontrol olarak kullandığımız suştaki ACC-1'in amplifikasyonunda kullanılan primer çiftinden farklı bir diziye sahiptir. Dolayısıyla primerler çalışmış; ancak kontrol suşundaki geni amplifiye edememiştir. (3) Pozitif fenotipik test sonuçlarına yol açan elimizdeki primerlerle amplifiye olmayan farklı bir *pAmpC* geni vardır. (4) Fenotipte gözlenen BA ile sinerji artışlarının kaynağı *pAmpC* dışında bir mekanizmadır. Burada BA'nın doğrudan antibakteriyel etkisi olabileceği akla gelebilir. Ancak sinerji testinde kullanılanla aynı miktarda saf BA içeren diskler, kayda değer bir inhibisyon zonu açmamıştır. Zaten AFB, 300 µg/ml dozunda antibakteriyel etkisi bulunmadığı için tercih edilen bir AmpC inhibitörüdür.

pAmpC varlığı ülkeler arasında değişen oldukça farklı oranlarda karşımıza çıkmaktadır. ABD'de yapılan bir çalışmada, 1995-1997 yılları arasında toplanan *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *P.mirabilis* izolatlarında sırasıyla %1.9, %7.6 ve %1.6 oranında *pAmpC* varlığı saptanmıştır²⁴. Alvarez ve arkadaşları²⁵ ise yine ABD'de, oksiminosefalosporinlere dirençli *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca* izolatlarının sırasıyla %4, %8.5 ve %6.9'unda *pAmpC* tespit etmişlerdir. *pAmpC* enzim üretimi bazı ülkelerde giderek artan oranlarda görülmekle birlikte, örneğin Hindistan'da farklı dönemlerde yapılmış çalışmalarda yıllar içinde artması beklenen *pAmpC* oranlarında böyle bir artış görülmediği, hatta azalma olduğu rapor edilmiştir^{6,18,26}.

Bizim çalışmamızda FOX dirençli 28 *E.coli* ve sekiz *K.pneumoniae* izolatının 10'unda pAmpC varlığı tespit edilmiştir. FOX dirençli tüm izolatlar arasında %27.7, çalışmaya dahil edilen tüm izolatlar arasında ise %0.8'lik bir prevalans söz konusudur. pAmpC varlığı tespit edilen tüm izolatların *E.coli* olduğu dikkati çekmiştir. Gerek dünya, gerekse Türkiye'den bildirilen oranlarla karşılaştırıldığında bu oran bir hayli düşük görünmektedir. Bizim çalışmamızda taranan izolatlar 2008-2011 dönemini kapsamaktadır. Sonuçlarımıza göre; hastanemizde 2008-2009 döneminde *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinde FOX dirençli izolat yoktur. FOX direnci, 2010 yılında görülmeye başlamış, 2011 yılında azalma gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 36 FOX dirençli izolatın 26'sı 2010 yılında, 10'u 2011 yılında izole edilirken; PCR ile pAmpC pozitif bulunan 10 izolatın sekizi 2010, ikisi 2011 yılına ait izolatlardır. Dirençli izolatların 2010 yılında görülmeye başlaması bir "milat" sayılabilirse de; sayılar çok düşük olduğu için 2010 yılından 2011 yılına doğru görülen azalmanın, genel bir eğilimi ifade edip etmediği konusunda yorum yapmak oldukça zordur.

Literatür verilerine göre, tüm dünyada pAmpC içeren izolatlarda en fazla karşılaşılan beta-laktamaz türü CMY-2 olup, bunu DHA-1 izlemektedir^{9,13,27}. Türkiye verilerine bakıldığında, pAmpC ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bal ve arkadaşları²⁸ 1995 yılında yayınlanan çalışmalarında, 13 *K.pneumoniae* izolatında CMY-2 enzim varlığını bildirmişlerdir. Demirbakan ve arkadaşları²⁹, FOX orta duyarlı veya dirençli bulunan 27 *E.coli* izolatının 2 (%7.4)'sinde CMY-2 benzeri enzim saptarken, *Klebsiella* izolatlarında pAmpC beta-laktamaz üretimine rastlamamışlar; pAmpC beta-laktamaz enzim sıklığını tüm izolatlar arasında %0.1; *E.coli* izolatlarında ise %0.14 olarak rapor etmişlerdir. Coşkun ve Altanlar²² ise, 20 *E.coli* ve iki *K.pneumoniae* olmak üzere, PCR ile pAmpC pozitif bulunan 22 izolatın hepsinin, CIT ailesine ait AmpC beta-laktamaz içerdiğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda pAmpC saptanan 10 izolatta CMY-2 geninin bulunması dünya ve Türkiye verileri ile uyumludur.

Çalışmamızda FOX dirençli 36 izolata uygulanan üç fenotipik testin doğruluk istatistikleri karşılaştırıldığında; BAİT'nin özgüllük ve pozitif prediktif değerinin (PPD) diğer iki testten yüksek olduğu; diğer testlerin (ACDT ve SHT) ise %100 gibi çok yüksek duyarlılık ve negatif prediktif değerlerine (NPD) rağmen özgüllüklerinin bir hayli düşük olduğu gözlenmiştir. ACDT, özgüllük ve PPD açısından SHT'ye göre daha yüksek oranlara sahiptir. Ancak bu geçerlilik oranlarının sadece FOX dirençli izolatlarla sınırlı olması ve çalışılan suş sayısının da az (n= 36) olması, bu verilerin temsil gücünü kısıtlamaktadır. FOX dirençli, gen negatif 26 izolat içinde; en az bir fenotipik testle pozitif izolat sayısı 11, en az iki testle pozitif izolat sayısı dokuz (8 izolat ACDT ve SHT ile, 1 izolat BAİT ve SHT ile) iken, sadece bir testle (ACDT) pozitif izolat sayısı ikidir. PCR negatif olmasına rağmen en az bir fenotipik testle pozitif bulunan 11 izolatı da -saptanamayan enzim varsayımı ile- toplam rakama dahil etsek bile (10 + 11= 21 izolat) pAmpC prevalansı %1.6'da kalmaktadır.

Sonuç olarak; dünyanın çeşitli bölgelerinde giderek önem kazanan pAmpC kaynaklı beta-laktam direncinin, ülkemizde de henüz düşük oranlarda olmakla birlikte ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Geçen zaman içinde belirgin bir artış eğilimi bulunmasa da, bu

direnç paterninin dikkatle izlenmesi, dirençli izolatların tespit edilmesi, olası salgınlara önlenmesi ve kontrolü açısından epidemiyolojik analizlerinin yapılması gerektiği söylenebilir. CMY-2 tipi enzimlerin birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de başlıca pAmpC tipini oluşturduğu görülmüştür. pAmpC'nin fenotipik olarak taranması ve doğrulanması amacıyla henüz standardize edilmiş bir yöntem bulunmamakla birlikte; FOX direncinin bir tarama testi olarak değerini koruduğu düşünülmektedir. SHT, ACDT ve BAİT yöntemlerinin tek başlarına yeterli özgüllük ve duyarlılıktan yoksun olduğu; BAİT'nin özgüllük ve PPD, diğer testlerin ise duyarlılık ve NPD açısından üstün özellikler taşıdığı; dolayısıyla BAİT'nin SHT veya ACDT testlerinden biri ile kombine edilmesi ile daha doğru sonuçlar elde edilebileceği öngörülebilir.

TEŞEKKÜR

pAmpC pozitif kontrol izolatlarını sağlayan, Elisande Miró (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), Vivi Miriagou (Hellenic Pasteur Institute, Atina) ve Dr. Burçin Şener (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara)'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med* 2008; 28(6): 401-12.
2. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1019-25.
3. Yang K, Guglielmo BJ. Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing organisms. *Ann Pharmacother* 2007; 41(9): 1427-35.
4. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3): 443-8.
5. Navaneeth BV. Extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a rural South Indian tertiary care hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(5): 602-3.
6. Lee K, Hong SG, Park YJ, et al. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(4): 319-23.
7. Ruppé E, Bidet P, Verdet C, Arlet G, Bingen E. First detection of the Ambler class C 1 AmpC beta-lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4204-7.
8. Hombach M, Mouttet B, Bloemberg GV. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC β -lactamase-producing clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(9): 2092-8.
9. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82.
10. Brenwald NP, Jevons G, Andrews J, Ang L, Fraise AP. Disc methods for detecting AmpC beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 600-1.
11. Da Silva Dias RC, Borges-Neto AA, D'Almeida Ferraiuoli GI, et al. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Cantarelli VV, Inamine E, Brodt TC, Secchi C, Cavalcante BC, Pereira Fde S. Utility of the ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect and confirm the presence of inducible AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae*. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(2): 237-9.
15. Derbyshire H, Kay G, Evans K, Vaughan C, Kavuri U, Winstanley T. A simple disk diffusion method for detecting AmpC and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(3): 497-501.
16. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1): 146-9.
17. Uluhan DZ, Gönüllü N. Klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik AmpC tipi beta-laktamaz direncinin araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32(6): 1586-93.
18. Mohamudha Parveen R, Harish BN, Parija SC. AmpC beta-lactamases among gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. *Braz J Microbiol* 2010; 41(3): 596-602.
19. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in *Enterobacteriaceae*. *J Med Microbiol* 2011; 60(Pt 6): 715-21.
20. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem- hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6): 1971-6.
21. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, et al. Use of boronic acid disk test to detect extended- spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(11): 3420-6.
22. Coşkun S, Altanlar N. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in clinical isolates of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 375-85.
23. Miró E, Mirelis B, Navarro F, Matas L, Giménez M, Rabaza C. *Escherichia coli* producing an ACC-1 class C beta-lactamase isolated in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2): 866-7.
24. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1791-6.
25. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(2): 533-7.
26. Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(2): 415-8.
27. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, et al. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(5): 1861-4.
28. Bal C, Bauerfeind A, Aydın A, Ang O. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik sefaminox CMY-2. *İnfeksiyon Derg* 1995; 9(1): 67-9.
29. Demirbakan H, Midilli K, Oğünç D, et al. Investigation of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase types in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* isolates resistant or intermediate to cefoxitin. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 545-51.