



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEFOKSİTİN DİRENÇLİ ya da AZ DUYARLI
SAPTANAN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*,
ESCHERICHIA COLI ve *PROTEUS MIRABILIS*
SUSLARINDAKİ PLAZMİD ARACILI AMPC BETA
LAKTAMAZ ENZİM TİPLERİNİN PCR YÖNTEMİ ve
DİZİ ANALİZİ ile ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hadiye DEMİRBAKAN

Antalya, 2007



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEFOKSİTİN DİRENÇLİ ya da AZ DUYARLI
SAPTANAN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*,
ESCHERICHIA COLI ve *PROTEUS MIRABILIS*
SUŞLARINDAKİ PLAZMİD ARACILI AMPC BETA
LAKTAMAZ ENZİM TİPLERİNİN PCR YÖNTEMİ ve
DİZİ ANALİZİ ile ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Hadiye DEMİRBAKAN

Tez Danışmanı: Doç.Dr. M. Dilara ÖĞÜNÇ
"Kaynak Gösterilerek Tezimden Faydalanılabilir"

Antalya, 2007

**"Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2006.04.0103.011)."**

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	ii
Şekiller Dizini	vi
Resimler Dizini.....	vii
Çizelgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Beta Laktamazların Yapısı ve Sınıflandırılması.....	5
2.3. AmpC Beta Laktamazların Hidrolitik ve İnhibitör Özellikleri.....	20
2.4. <i>ampC</i> ile Kodlanan Genlerin Yayılımı.....	21
2.5. Epidemiyoloji.....	22
2.6. AmpC Beta Laktamazların Tanımlanması.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1. GEREÇ.....	27
3.2. YÖNTEM.....	29
4. BULGULAR.....	45
4.1. Sefoksitin Duyarlılığı.....	45
4.2. Üç Boyutlu Test ve Kombine Disk Test.....	45
4.3. İzoelektrik Odaklama.....	49
4.4. Multiplex PCR.....	49
4.5. TEM, SHV ve CTX-M PCR Sonuçları.....	50
4.6. Dizi Analizi.....	52
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR.....	59
7. ÖZET.....	61
8. ABSTRACT.....	62
9. KAYNAKLAR.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AM	Ampisilin
AMC	Amoksisilin-klavulanat
AN	Amikasin
ATCC	American Type Cultere Collection
AZT	Aztreonam
bp	Base pair
CAM	Cefoxitin agar medium
CAZ	Seftazidim
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CIP	Siprofloksasin,
CLSI	Clinical Laboratory Standards Instutite
CRO	Seftriakson
CTX	Sefotaksim
dATP	Deoksi adenin trifosfat
dCTP	Deoksi sitozin trifosfat
ddUTP	Dideoksi urasil trifosfat
ddGTP	Dideoksi guanin trifosfat
ddATP	Dideoksi adenin trifosfat
ddCTP	Dideoksi sitozin trifosfat
dGTP	Deoksi guanin trifosfat
dITP	2'deoksiinozin 5' trifosfat
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
dTTP	Deoksi timin trifosfat
EB	Elution buffer
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Etilendiamintetraasetat
F	Forward
FEP	Sefepim
FOX	Sefoksitin
g	Gram
GSBL (ESBL)	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (Extended Spectrum Beta Lactamases)
GM	Gentamisin
<i>H. alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
I	Az duyarlı
IBL	İndüklenebilir beta laktamaz
IC ₅₀	İnhibisyon sabiti
IEF	İzoelektrik odaklama yöntemi
IP	İmipenem
IS	İnserisyon segmenti
pI	İzoelektrik nokta
KA	Klavulanik asit
K_m	Michaelis sabiti
<i>K oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LEV	Levofloksasin
M	Molar
mA	Miliamper
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
<i>M. morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>
MW	Moleküler ağırlık

Na ₂ EDTA	Sodyum Etilendiamintetraasetat
NaH ₂ PO ₄ -1 H ₂ O	Sodyum fosfat, mono-sodyum tuzu
Na ₂ HPO ₄ -7 H ₂ O	Sodyum fosfat, di-sodyum tuzu
NaOH	Sodyum hidroksit
OMP	Dış membran proteini
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Pulsed field jel elektroforez
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
pmol	Pikomol
<i>P. rettgeri</i>	<i>Proteus rettgeri</i>
<i>P. stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
R	Reverse
R	Dirençli
rpm	Dakika dönme sayısı
S	Duyarlı
SAM	Ampisilin-sulbaktam
SCF	Sefaperazon-sulbaktam
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
SXT	Trimetoprim-sulfametaksazol
TEMED	N, N'-tetrametilen-etilendiamin
<i>tnp</i>	Transpozon
TSB	Tryptic Soy Broth
TZP	Piperasilin-tazobaktam
U	Ünite
V	Volt
W	Watt
w/v	Ağırlık/Hacim
xg	Çöktürme hızı
<i>V_m</i>	Maksimum hız
µl	Mikrolitre

μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kromozomal AmpC indüksiyon mekanizması.....	13
2.2. Kromozomal ve plazmidle kodlanan AmpC.....	19
beta laktamaz enzimlerinin aralarındaki ilişkiyi gösteren Clustal X ile hesaplanarak hazırlanmış dendogram	

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
2.1. Sınıf A, sınıf B, sınıf C, sınıf D'ye ait bazı beta.....	6
laktamazların strüktürel görünümüleri	
4.1. CMY-2 benzeri enzim salgıladığı belirlenen <i>E. coli</i> suşlarının.....	47
üç boyutlu test sonucu oluşturdıkları distorsiyonların görüntüleri	
4.2. Üç boyutlu test pozitif olarak saptanan suşlardan bazılarının.....	49
poliakrilamid jel görüntüleri	
4.3. Birinci grup primerler ile multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel.....	50
elektroforez görüntüleri	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Beta laktamazların sınıflandırılması	8
2.2. Antibiyogramın yorumlanması.....	10
2.3. Organizmaların MIK değerlerine göre indüksiyon potansiyelleri.....	12
2.4. Plazmid kökenli AmpC beta laktamazların sınıflandırılması.....	16
3.1. Multipleks PCR'da kullanılan öncül setleri.....	32
3.2. PCR'da kullanılan family-spesifik öncül setleri.....	37
3.3. PCR'da kullanılan öncül setleri.....	39
3.4. Dizi analizinde kullanılan öncül setleri.....	43
4.1. Suşların üç boyutlu test sonuçları ile disk difüzyon.....	45
yöntemiyle belirlenen sefoksitin duyarlılıklarının karşılaştırılması	
4.2. Distorsiyon büyüklüğü ile disk difüzyon yöntemiyle.....	46
belirlenen sefoksitin duyarlılıklarının karşılaştırılması	
4.3. Üç boyutlu test pozitif olan suşları disk difüzyon.....	48
yöntemiyle saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları	
4.4. Üç boyutlu test ve kombine disk test pozitif olan suşların.....	51
tüm test sonuçları	

1. GİRİŞ

Dirençli mikroorganizmalar, genellikle hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olsalarda, günümüzde toplum kökenli infeksiyonlarda da karşımıza çıkmaktadırlar. Bu durum tedavi maliyetini arttırdığı gibi, mortalite oranında da artışa yol açmaktadır.

Gram negatif enterik basiller hastane kaynaklı infeksiyon etkenleri arasında ön sırada yer almaktadırlar. Beta laktam ajanlar Gram negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarda geniş etki spektrumları ve güvenli olmaları nedeniyle tüm dünyada yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerde beta laktam antibiyotik direncindeki en önemli mekanizma beta laktamaz sentezidir. Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından farklı, dörtüzdenden fazla beta laktamaz tanımlanmıştır (1).

Fenotipik olarak sınıf C (AmpC) beta laktamazlar, Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre grup 1 beta laktamazlar içerisinde yer almaktadırlar (2, 3). Bu enzimler *Salmonella* ve *Klebsiella* türleri dışında hemen tüm Gram negatif bakterilerce değişik oranlarda oluşturulan enzimlerdir. Tüm dünyada yaygın olan bu enzimlerin sayısı günümüzde otuza ulaşmıştır.

Tipik olarak penisilinleri ve sefalosporinlerin çoğunu inaktive edebilme yeteneğinde olduklarından çoklu beta laktam direncine yol açabilmektedirler. AmpC üreten suşların tedavisinde oldukça kısıtlı seçenek olmakla beraber, karbapenemler ve kinolonlar bu mikroorganizmaların yol açtığı infeksiyonlarda kullanımı önerilen antibiyotiklerdir.

AmpC beta laktamazların saptanmasında Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'nin önerisi bulunmamaktadır (4). Antibiyotik duyarlılık testlerinde sefoksitine ve seftazidim, seftriakson gibi üçüncü kuşak sefalosporinlere direncin varlığı, o mikroorganizmada AmpC enziminin olabileceğini düşündürmektedir. Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda sefoksitine ve üçüncü kuşak sefalosporinlere direnci olan bir suşda; üç boyutlu test gibi fenotipik testlerde pozitifliğin saptanması, izoelektrik odaklama yöntemiyle (IEF) enzimin uygun izoelektrik noktaya (pI) sahip olması ve tüm bunların moleküler

testler ile desteklenmesi, AmpC beta laktamaz varlığını göstermede kullanılan yöntemlerdir.

Çalışmamızda, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)'nın sefoksitine dirençli suşlarındaki plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz sıklığını, üç boyutlu test, IEF, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle belirlemek ve direnç genlerinin araştırılmasında altın standart olan DNA dizi analizi ile bölgemizdeki direnç tiplerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

1929 yılında Fleming bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığını gözlemlemiştir. 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından *E. coli*'den elde edilen ekstrenin penisilinin etkisini ortadan kaldırdığının gösterilmesi ile beta laktamaz enzimi varlığı doğrulanmıştır. Abraham ve Chain elde ettikleri enzime "penisilnaz" adını vermişlerdir (5, 6).

Yine 1940'lı yıllarda Kirby disk duyarlılık testlerini geliştirmiş, 1944 yılında, stafilokokların penisiline duyarlı ve dirençli suşlarını karşılaştırdığında penisiline dirençli olanlarda bu enzimin bulunduğunu saptamıştır. Çalışmalar 1960'lı yıllara kadar stafilokokların penisilnazları üzerinde yoğunlaşmış; bu ilacın yaygın kullanımı sonucu önce hastanelerde, daha sonra da toplumda stafilokoklarda penisilin direnci büyük bir artış göstermiştir (5, 7).

Daha sonraki yıllarda semisentetik penisilinlerin, 1. Kuşak sefalosporinlerin (sefaloridin ve sefalotin) geliştirilmesi ve bu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıma girmesi ile Gram negatif bakterilerde bulunan beta laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmiştir. Gram negatif bakterilerde ilk plazmid kontrolündeki beta laktamaz 1960'lı yılların başında "Temoniera" isimli bir hastanın kanında üreyen *E. coli*'de bulunmuş, hastanın adının baş harfleri kullanılarak TEM-1 olarak isimlendirilmiştir. Uzun yıllar Gram negatif bakterilerde bulunan beta laktamazlar birkaç çeşit ile sınırlı kalmıştır. Ancak 1978 yılından sonra birçok yeni beta laktam antibiyotiğin kullanıma girmesi ile eş zamanlı olarak beta laktamazların sayı ve çeşidinde ani bir artış gözlenmiş, daha sonraki yıllarda plazmidle kodlanan sınıf C beta laktamazlar ortaya çıkmıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinde üçüncü kuşak sefalosporinleri inhibe eden beta laktamaz enzimlerinin saptanması 1980'li yıllarda olmuştur.

1976 yılında Bobrowski ve ark tarafından ilk kez *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) suşunda plazmidle taşınan bir sefalosporinaz bulunmuş, enzimin hidrolitik özelliğinden dolayı Richmond ve Sykes şemasındaki kromozomal beta laktamazlara benzetilmiş ve daha sonra Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırma şemasına göre grup 1 sefalosporinaz olarak sınıflandırılmıştır (8). Bu sefalosporinaz muhtemelen *E. coli* AmpC beta laktamazından orjin almıştır.

Çünkü sadece *E. coli* AmpC beta laktamazının antiserumu ile reaksiyon vermiş, diğer Enterobakteriyal AmpC beta laktamaz antiserumları ile reaksiyon vermemiştir (8). Fakat plazmid saklanma sırasında kaybolduğu için transfer deneyleri doğrulanamamış ve daha ileri moleküler çalışmalar yapılamamıştır (9, 3). 1982 yılında Levesque ve ark *Achromobacter* türlerinde plazmid aracılı bir sefalosporinaz bulmuşlardır. Orjinal suş kaybolduğu için daha sonraki çalışmalarda bakterideki beta laktamaz geni gösterilememiş, ancak enzimin retrospektif olarak biyokimyasal özellikleri incelendiğinde, grup 1 sefalosporinazlardan daha çok grup 2b geniş spektrumlu enzimlere benzetilmiştir (10). 1983'de Knothe ve çalışma arkadaşları sefoksitin direncinin *Serratia marcescens* (*S. marcescens*)'den *Salmonella* ve *Proteus* türlerine aktarılabildiğini göstermişlerdir (11). 1980'li yılların sonlarına doğru da *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin klinik izolatlarında AmpC beta laktamaz aktivitesinin varlığı gözlenmiştir (3). 1989 yılında Bauernfeind ve ark tarafından Güney Kore'de plazmid aracılı sınıf C beta laktamaz (CMY-1) üreten sefamisin dirençli *K. pneumoniae* suşu rapor edilmiştir (12). Yapılan çalışmalarla sefoksitine, sefotetana olduğu gibi penisilinlere, oksimino sefalosporinlere ve monobaktamlara da dirence neden olan bu enzimin izoelektrik noktasının 8.0 olduğu, sulbaktama klavulanat ve tazobaktamdan daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (12). Bununla birlikte ilk kez Papanicolaou ve ark tarafından bir sınıf C beta laktamazın plazmid üzerinde bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada sınıf 1 beta laktamaz özelliklerine sahip olan bu enzim (MIR-1) aracılığıyla α metoksi ve oksimino beta laktamlara direncin gelişebildiği ve MIR-1 geninin *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) *ampC* geni ile %90 benzer olduğu belirlenmiştir (13). Daha sonraları plazmid aracılı sınıf C beta laktamazlar tüm dünyada saptanmaya başlamıştır.

Başlangıçta bu beta laktamazlara nadir olarak rastlanan enzimler gözüyle bakılmış, plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz ailesine ait yeni üyelerin sayısı arttıkça bu enzimlerin direnç özelliklerinin klinikle ilişkisi ortaya çıkmıştır. Genellikle sporadik olarak görülmelerine rağmen plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz enzimi taşıyan *K. pneumoniae* suşları ile nozokomiyal infeksiyon salgınları da bildirilmiştir (13, 14, 15, 16). ABD'deki iki salgının sefoksitin

dirençli *K pneumoniae*'nin farklı türlerinin poliklonal yayılımı ile meydana geldiği bildirilirken, Yunanistan'daki ve Fransa'daki salgının ise monoklonal olduğu saptanmıştır (13, 14, 15, 16).

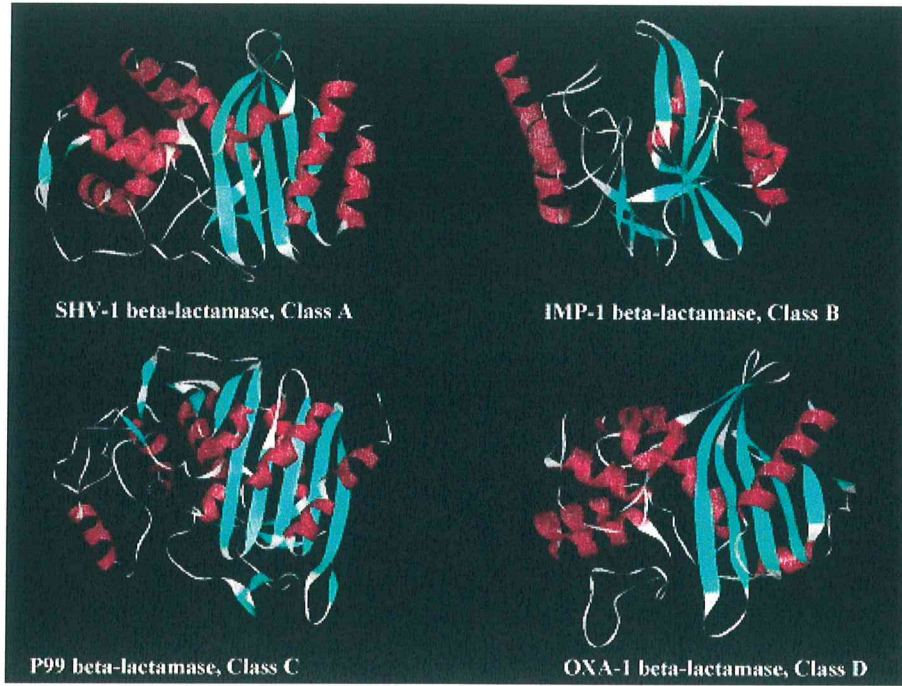
Antibiyotiklerin yaygın kullanımıyla, bu antibiyotiklere karşı oluşan direncin zaman içinde artması, ilaç endüstrisini yeni grup antibiyotikler üretmeye yöneltse de, bu antibiyotiklere karşı da yeni direnç mekanizmalarının mikroorganizmalar tarafından durmaksızın geliştirileceğini bizlere göstermektedir.

2.2. Beta Laktamazların Yapısı ve Sınıflandırılması

Beta laktam antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların sağaltımında kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedirler. Bu grup antibiyotiklerden penisilin ve sefalosporinler, dünya antibiyotik pazarının yaklaşık %65'ini teşkil etmektedir (1). Kimyasal yapısındaki beta laktam halkası nedeniyle bu şekilde adlandırılmış olan beta laktam antibiyotikler, etkilerini peptidoglikan sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak gösterirler. Ancak bakterisidal etkileri, bakteriyel otolizinlerin aktive olmasına bağlıdır.

Başta *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri olmak üzere Gram negatif bakterilerde, beta laktam antibiyotik direncindeki en önemli mekanizma beta laktamaz sentezidir.

Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağı parçalayarak etki gösteren, yapısal olarak birbirine benzeyen alfa heliks ve beta kıvrımlı tabakalarla karakterize globuler proteinlerden oluşurlar (resim.2.1) (17).



Resim.2.1. Sınıf A, sınıf B, sınıf C, sınıf D'ye ait bazı beta laktamazların strüktürel görünimleri (17).

Beta-laktamazlar başta Gram negatif bakteriler olmak üzere, Gram pozitif ve anaerop bakteriler tarafından sentezlenirler. Genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir. Bu enzimler Gram pozitif türlerde doğrudan dış ortama salınırlarken, Gram negatif bakterilerde periplazmik aralıkta bulunurlar. Bu nedenle Gram negatif bakterilerde beta laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol almaktadır (1, 18).

Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından farklı dörtyüzden fazla beta laktamaz tanımlanmıştır (1).

Beta laktamazlar için farklı zamanlarda pek çok sınıflandırma şemaları ortaya atılmış olsa da bunlar arasında yaygın olarak kabul gören ilk şema 1960'larda Richmond ve Sykes tarafından geliştirilmiştir. Zamanla bu şemada hatalar ve eksiklikler görülünce 1989 yılında Karen ve Bush tarafından değiştirilmiş, 1995 yılında da en son olarak Bush-Jacoby-Medeiros tarafından yeniden uyarlanmıştır. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırma şeması, beta laktamazların yapısal özelliklerinin yanı sıra substrat ve inhibitör profilleri gibi

işlevsel özelliklerinin de değerlendirildiği en yaygın kullanılan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmada enzimler dört ana grupta toplanmıştır (17, 19, 20). Bu dört büyük grup (sınıf 1, sınıf 2, sınıf 3, sınıf 4) aynı zamanda içlerinde çok sayıda alt grubu da içermektedirler.

Ambler tarafından 1980 yılında yapılmış olan ikinci sınıflandırma ise, enzimlerin nükleotid ve aminoasit dizilerinin benzerliklerine dayanan moleküler sınıflandırmadır (7). Bu sınıflandırmada dizileri bugüne kadar belirlenebilen beta laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfta toplanmaktadır. A, C ve D sınıfı beta laktamazlar aktif bölgelerinde "serin" aminoasidini içermekte iken, B sınıfı beta laktamazların aktif bölgelerinde "çinko" bulunmaktadır. Ambler sınıf A enzimleri çoğunlukla plazmid kontrolünde olan penisilinazlardır. Sınıf B beta laktamazlar, aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı bir tiyol grubu bulunan metalloenzimlerdir. Bu enzimlerin çoğu karbapenemaz aktivitesi taşımaktadır. D sınıfı enzimler oksasilinazlardır ve oksasilini hızla hidrolize ederler (7, 19). C sınıfı enzimler sefalosporinazlardır ve çoğunlukla kromozom kontrolündedirler (çizelge.2.1).

Çizelge.2.1. Beta laktamazların sınıflandırılması

Bush Jacoby	Molekül sınıf	Tercih edilen substrat	İnhibisyon		Örnek enzimler
			KA	EDTA	
1	C	Sefalosporinler	-	-	Gram negatif bakterilerin kromozomal ve plazmid kökenli AmpC enzimleri (MIR-1, BIL-1, MOX-1, CMY-1, LAT-1, FOX-1, ACT-1)
2a	A	Penisilinler	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-19, SHV-25, TLE-2, ROB-1, OHIO-1, HMS-1
2be	A	Penisilinler, Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, Monobaktamlar	+	-	TEM-3-29, TEM-42,43, TEM-47-50,TEM-92 SHV-2-9, SHV-12-18, SHV-20-25 PER-1,2. CTX-M-1-16. GES-1,2. VEB-1,2. TOHO-1,2. <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Penisilinler	±	-	TEM-30-36, TEM 38-41, 44, 45, 51,59,.....83
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3-5, BRO-1-3, SAR-1
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	±	-	OXA tipi enzimler (OXO-1-31) Dar spektrum: OXA-1-10, OXA-20,27,30,31 GSBL etkili: OXA-11-19, OXO-28 Karbapenem hidrolizi yapanlar: OXA-23-27
2e	A	Sefalosporinler	+	-	<i>P. vulgaris</i> 'in İndüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	+	-	<i>E. cloacae</i> 'nın NMC-A ve <i>Serratia</i> 'nın Sme-1 enzimi
3	B	Tüm beta laktamlar (monobaktamlar hariç)	-	+	<i>Xanthomonas maltophilia</i> 'nın L1 ve <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CcrA enzimi
4	?	Penisilinler	-	?	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın penisilinazları

Kaynak no 19 ve 21'den uyarlanmıştır. KA: Klavulanik asit

Fenotipik olarak sınıf C (AmpC) beta laktamazlar Bush grup 1 beta

laktamazlar içerisinde yer alırlar (2, 3). Kromozomal *ampC* geni tarafından kodlandıkları için “AmpC tipi enzimler” olarak da bilinirler ve *Salmonella*, *Klebsiella* dışında hemen tüm Gram negatif bakterilerce değişik derecelerde oluşturulurlar.

Son yıllarda klinikte *Enterobacteriaceae* türleri ile ilgili en önemli sorun, kromozom kontrolündeki grup 1 beta laktamazlar ve plazmid kontrolündeki genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (GSBL=ESBL=Extended Spectrum Beta Lactamases).

Sınıf C beta laktamazlar tipik olarak penisilinleri ve sefalosporinlerin çoğunu inaktive edebilme yeteneğinde olduklarından çoklu beta laktam direncine yol açabilmektedirler. Klavulanat ve *p*-kloromercuribenzoat ile ya inhibe olmazlar ya da düşük oranda inhibe olurlar. Penisilanik asit sülfonlarına (tazobaktam ve sulbaktam), klavulanata, monobaktamlara (aztreonam), 3. kuşak sefalosporinlere (oximino sefalosporinler; sefotaksim, seftazidim, sefpodoksim), sefamisinlere (7- α metoksi sefalosporinler; sefoksitin, sefotetan) dirençli ancak karbapenemlere ve daha az oranda sefepime, sefpiroma duyarlıdırlar (2, 3, 9, 22, 23). Yapılan bir çalışmada tüm CMY-1 tipi AmpC beta laktamaz üreten suşlarda sefepimin etkisi inokulum miktarı ile ilişkilendirilmiş ve inokulum miktarı yükseldikçe sefepim minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) değerinin de arttığı görülmüştür (24). Bu nedenle ciddi infeksiyonlarda bu antibiyotiğin kullanımında dikkatli olmak gerekmektedir.

Sınıf A beta laktamazlarla kıyaslandığında sınıf C beta laktamazların aktif bölgeleri daha geniştir. Bu nedenle büyük yan zincirleri olan oksimino sefalosporinleri bağlayabilirler. Yine yapısal özellikleri nedeniyle açıl-enzim türevinin su molekülünce kolaylıkla ayrılması mümkün olmaktadır. Buna tek istina karbapenemlerdir. Sınıf C beta laktamaz imipenem ile bağlandığında antibiyotiğin 6 α pozisyonundaki büyük hidroksietil yan zinciri, açıl-enzim türevinin elektrofilik açıl merkezini hidrolitik saldırıdan koruyacak şekilde kaydırmaktadır. Bunun sonucunda enzim, açıl türevinden ayrılmamakta ve inhibe olmaktadır.

Yüksek düzeyde AmpC tipi beta laktamaz üreten suşlarla, GSBL üreten suşların farkı; bu mikroorganizmalarda 3. kuşak sefalosporinlere ek olarak

sefamisinlere de direncin görülmesi ve bu direncin klavulanat, sulbaktam, tazobaktam ile kombine beta laktam ilaçlarla inhibe edilememesidir (3, 7, 9, 25). Ancak GSBL enzimleri sefoksitin, sefotetan ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar (çizelge.2.2).

Çizelge.2.2. Antibiyogramın yorumlanması (17)

Beta	Duyarlılık Paternleri				İnhibitörlere Duyarlılıkları	
	Laktamazlar	Seftazidim	Sefotaksim	Sefoksitin	İmipenem	Klavulanat
ESBL	R	R	S	S	var	yok
AmpC	R	R	S, R	S	yok	yok
Karbapenemazlar						
Sınıf A	R	R	S	R	var/yok	yok
Sınıf B	R	R	S, R	R	yok	var
Sınıf D	R	R	S, R	R	yok	yok

R; dirençli, S; duyarlı

Sınıf C enzimlerin karbapenemler üzerine etkileri son derece az olmasına karşın, aşırı üretimleri ile birlikte dış membran porin değişiklikleri de varsa karbapenem direncine yol açabilmektedirler (17). *E. coli*'de oximino sefalosporinlere ve sefamisinlere direnç kromozomal AmpC enziminin aşırı üretimi ve dış membran protein (OMP) kaybının birlikteliğine bağlı olabileceği gibi, *K. pneumoniae*'de yalnızca OMP üretimindeki yetersizliğe bağlı olabilir (3). ACC-1 tipi AmpC beta laktamaz üreten suşlar sefamisinlere duyarlıdırlar (3).

AmpC enzimleri 4. kuşak sefalosporinlere göreceli olarak dayanıklıdırlar. Çünkü 4. kuşak sefalosporinlerin AmpC beta laktamaz enzimlerine karşı hem affiniteleri hem de dayanıklılıkları düşüktür. Ancak bu antimikrobiyaller Gram negatif bakterilerin periplazmik aralıklarına hızla penetre olduklarından, ciddi infeksiyonlarda veya ampirik tedavide kullanılabilirler. Sefepimin invitro etkinliğinin inokulum miktarına bağlı olarak değiştiği göz önüne alınacak olursa, tedavide kullanımı ile ilgili tereddütler halen devam etmektedir.

AmpC tipi enzimler, aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle

klavulanik asit ve sulfonların beta laktam halkalarına bağlanmazlar. Bu nedenle de bu beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (18). Ancak çeşitli yayınlarda bazı AmpC enzimlerinin (örneğin; MOX-1) beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olabileceği belirtilmektedir (7, 26). Laboratuvar uygulamalarında AmpC tipi beta laktamazların spesifik inhibitörleri vardır, ancak (örneğin; monobaktam Ro 48-1256, LN 2-128, LN 48-1220 ve Syn 2190) ticari olarak bu inhibitörler bulunmadıkları için AmpC ve GSBL tipi beta laktamazlar arasındaki farklılığı belirlemede kullanılamamaktadırlar (3).

Kromozomal beta-laktamazlar Gram negatif bakterilerin hemen hepsinde yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak bunların miktarı, sentez yolu ve dirençteki rolleri farklıdır. *Enterobacteriaceae* ailesinin büyük çoğunluğu kromozomal enzimlere sahiptir. Bu enzimlerden bazıları (SHV-1, K1) Ambler sınıf A'da yer alırken, büyük çoğunluğu da sınıf C'de yer alır (12).

Sınıf C beta laktamazlar *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden özellikle *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), *E. cloacae*, *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*), *Providencia stuartii* (*P. stuartii*), *E. coli*, *Morganella morganii* (*M. morganii*), *S. marcescens*, *Hafnia alvei* (*H. alvei*), *Yersinia enterocolitica*, *Proteus rettgeri* (*P. rettgeri*) ile *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Aeromonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Lysobacter lactamgenus*, *Chromobacterium violaceum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Psychrobacter immobilis*, *Rhodobacter sphaeroides* gibi Gram negatif bakterilerde bulunurlar. *Salmonella*, *Klebsiella spp.* ve *P. mirabilis*'in kromozomlarında *ampC* geni yoktur (9). *Salmonella enterica*'nın genetik haritasında bir *ampC* lokusu bulunmakla birlikte, serotip Typhimurium ve Paratyphi B'nin tüm genom analizi sonucunda bu genin varlığı gösterilememiştir (27). Bu nedenle *Salmonella* genusunun AmpC üretmediği kabul edilir (18). *Shigella sonnei* ile *E. coli ampC* geni taşır, fakat enzim çok küçük miktarlarda salgılanmaktadır (3, 22). *Shigella flexneri* ve *Shigella dysenteriae*'deki *ampC* geni büyük bir delesyon bölgesi taşıması nedeniyle eksprese olmamakta veya enzim çok düşük düzeyde salgılanmaktadır (28).

Enzim ekspresyonu "indüklenebilir", "yüksek düzeyde yapısal" veya "düşük düzeyde yapısal" olabilir. Örneğin *E. coli* ve *Shigella* türlerindeki enzim sentezi yapısaldır ve miktarı dar spektrumlu sefalosporinlere direnç

oluşturmayacak kadar düşük düzeydedir. Buna karşın, *E. coli* izolatlarının %2'sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir (12, 29). *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *C. freundii*, *Serratia spp.*, *M. organii*, *P. stuartii* ve *P. rettgeri*' de bulunan grup 1 beta laktamazlar da *E. coli*' deki beta laktamazlara benzemektedir. Ancak bu bakterilerdeki enzimler indüklenebilen türdedir (7, 9, 29, 30). Ortamda ampicilin veya birinci kuşak sefalosporinler gibi güçlü bir indükleyici olduğunda enzim üretimi indüklenir ve bu antibiyotikler etkisiz hale gelir (26). İndükleyici ajan ortadan kalktığında sentez tekrar bazal seviyeye iner. Bu nedenle, bu beta laktamazlar “indüklenebilir beta laktamazlar (IBL)” olarak adlandırılırlar. IBL’ler, yüksek düzeyde üretildiklerinde karbapenemler hariç tüm beta laktamları parçalayabilme özelliğindedirler.

Çizelge.2.3’de çeşitli antimikrobiyallerin indüksiyon potansiyelleri verilmiştir.

Çizelge.2.3. Organizmaların MIK değerlerine göre indüksiyon potansiyelleri (30)

İndüksiyon Potansiyelleri

Yüksek	Karbapenemler ve Sefamisinler
	Aminopenisilinler
	Karbenisilin, Tikarsilin
	Üreidopenisilinler
	1., 2. ve 3. kuşak Sefalosporinler
	Klavulanik asit
	Sefpirom, Sefepim
	Sülfon inhibitörleri
Düşük	Aztreonam

Normal koşullar altında klinik olarak önemli Gram negatif bakterilerde AmpC tipi beta laktamaz yapımı baskılanmıştır. Baskılanma ve aktivasyon hücre duvar sentezi ve yıkımı (peptidoglikan dönüşüm siklusu) ile yakından ilişkilidir. Bu aktivasyon ve baskılanma süresince *ampC*'nin (beta laktamaz geni) yanı sıra transkripsiyonel düzenleyiciyi kodlayan *ampR*, indüksiyonu baskılayan enzimi kodlayan *ampD* ve indüksiyon sinyali için permeaz işlevi gören bir transmembranik proteini kodlayan *ampG* olmak üzere 3 gen daha

bulunmalıdır. *AmpR* bu süreçte hem baskılayıcı hem de aktivatör olabilir. *AmpR* bir peptidoglikan öncülü olan UDP-N-asetilmuramik asit-pentapeptid (UDP-Mur-Nac-pentapeptid) ile bağlı olduğunda baskılayıcı olarak işlev görür; *ampC* transkripsiyonunu aktive edemez. Ancak ortamda hücre duvarının yıkım ürünü olan anhidro-Mur-Nac-tripeptid veya anhidro-Mur-Nac-pentapeptid yüksek oranlarda bulunduğunda UDP-Mur-Nac-pentapeptid *ampR*'den ayrılır ve *ampR*, *ampC* transkripsiyonunu aktive eder. *AmpC* transkripsiyonundaki artış beta laktam antibiyotik etkisi ile meydana gelebilir. Bazı beta laktam antibiyotikler peptidoglikandan yüksek miktarda anhidro-Mur-Nac-tripeptid ve/veya pentapeptid salınımına neden olmaktadır. Beta laktamaz indükleyici sinyal olarak işlev gören bu peptidoglikan yıkım ürünleri hücreye bir kanal (*ampG*) aracılığı ile girer. Yıkım ürünleri normalde muropeptidlerin dönüşümünü sağlayan bir enzim olan *ampD* (N-asetil-anhidromuramil-L-alanin amidaz)'nin kapasitesini aşarsa sitoplazmada birikerek indükleyici etki gösterir ve beta laktamaz sentezi başlar (şekil.2.1). Beta laktamaz salınımı ancak indükleyici sinyal sürdükçe yani ortamda antibiyotik bulundukça devam eder.

10^{-6} - 10^{-8} sıklıkta ortaya çıkabildiği bildirilmektedir (17). Bu mutantlarda *ampD* geninin yapısal değişimi, bir Zn^{+2} bağımlı amidaz olan *ampD* yapımının baskılanmasına ve sitoplazmada sürekli olarak anhidro-Mur-Nac-tripeptid birikmesine neden olur. Böylece indüksiyon sinyalinin sürekli olması nedeniyle *ampR* aktivatör olarak işlev görerek yüksek düzeyde *ampC* üretimine neden olur (17). *Enterobacteriaceae* bakteriyemilerinde dereprese mutantların seçilme olasılığının %20'lere kadar çıktığı belirlenmiştir. Bu nedenle *Enterobacter spp.*, *C. freundii*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *P. aeruginosa* ve *M. morganii* üçüncü kuşak sefalosporinlere in vitro testlerde duyarlı görünseler bile sonuçların dirençli olarak bildirilmesi önerilmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması bu nedenle büyük önem taşımaktadır. Bu olay aynı zamanda, kullanılan antibiyotik konsantrasyonu, suşların özellikleri, inokulumun yoğunluğu, enfeksiyonun yeri ve ilacın ulaşabildiği düzey ile de ilişkilidir. Pnömoni ve bakteriyemi gibi enfeksiyonlarda seleksiyon olasılığının yüksek olmasına karşın, üriner sistem enfeksiyonlarında, ulaşılan ilaç düzeyinin dereprese mikroorganizmalar için MİK değerlerinin üzerinde olması nedeniyle düşük olduğu belirtilmektedir (7, 9, 29, 30). Bu türlerle gelişen enfeksiyonlarda 2. ve 3. kuşak sefalosporinlerin, aztreonamın ve üreidopenisilinlerin tek başına kullanılmasından kaçınılması ve uzun süreli tedavi söz konusu ise bu türlerin antibiyotik duyarlılık testlerinin 3-4 günde bir tekrarlanması önerilmektedir (31). Çünkü bu antibiyotikler zayıf indükleyici olmalarına rağmen üretilen enzime duyarlıdırlar. Üçüncü kuşak sefalosporinlerle bakteriyemi tedavisi sırasında dereprese mutantların seçilme sıklığı %20-40 arasında bildirilmektedir (18, 22). Birçok çalışmada, sefalosporin kullanım öyküsü (özellikle seftazidim), cerrahi ve invaziv girişimlerin varlığı, yoğun bakımda uzun süreli kalma ve çoklu dirençli *Enterobacteriaceae* kökenlerinin dışkıda kolonize olması enfeksiyon oluşmasında risk faktörü olarak gösterilmiştir.

Plazmidler bakteri hücre kromozomundan bağımsız, sitoplazmada yer alan çembersel DNA parçalarıdır. Taşıdıkları genetik şifre bakterinin yaşaması için mutlak gerekli değildir, bakteriye antibiyotik direnci gibi çevre koşullarına dayanma yeteneği sağlarlar (32). Bir plazmid üzerinde birden fazla antibiyotik

direnç geni bulunabilir. Örneğin bir bakteri, plazmidleri üzerinde farklı beta-laktamazları kodlayan genlerle birlikte aminoglikozidleri parçalayan enzimi kodlayan genetik şifreyi de birlikte taşıyabilir. Bakteriler plazmidleri aracılığı ile antibiyotik direnç genlerini birbirlerine aktarabilirler. Böylece plazmidin aracılık ettiği bir direnç kolayca bakteriler arasında yayılabilmektedir (33).

Son 10 yılda kromozomal AmpC genlerinin plazmidlere aktarılması sonucu ortaya çıkan plazmid kökenli AmpC beta laktamazların sıklığı giderek artmıştır. Plazmid kaynaklı beta laktamazlar farklı farklı bakterilerde saptanabildiği gibi tüm dünyada başlıca *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de bulunurlar (3, 9, 34). Plazmid kaynaklı AmpC enzimlerinin kromozomal olanlardan farkı indüklenemez olmalarıdır (3, 9, 35). Ancak ACT-1, DHA-1 ve DHA-2 indüklenabilir yapıda olan plazmid kaynaklı enzimlerdir.

Günümüzde sayıları otuza yaklaşmış olan plazmid kökenli AmpC beta laktamazlar aminoasit sekans homolojilerine ve varsayılan progenitör AmpC enzimlerine göre beş subgruba ayrılırlar. Subgrup C₁, Subgrup C₂, Subgrup C₃, Subgrup C₄ ve Subgrup C₅ (çizelge.2.4) (2, 3, 22).

Çizelge.2.4. Plazmid kökenli AmpC beta laktamazların sınıflandırılması (Kaynak no 36'den uyarlanmıştır.)

SINIF	ENZİM	Kökeni olan mikroorganizma
CIT (Subgrup C ₁)	LAT-1, -2, -3, -4, CMY-2, -3, -4, -5, -6, -7, BIL-1	<i>C. freundii</i>
MOX (Subgrup C ₂)	MOX-1, -2, CMY-1, CMY-8, -9, -10, -11	<i>Aeromonas spp.</i>
FOX (Subgrup C ₂)	FOX-1, -2, -3, -4, -5	<i>Aeromonas spp.</i>
EBC (Subgrup C ₃)	MIR-1, ACT-1	<i>Enterobacter spp.</i>
DHA (Subgrup C ₄)	DHA-1,-2	<i>M. morganii</i>
ACC (Subgrup C ₅)	ACC	<i>Hafnia alvei</i>

Subgruplar, köken aldıkları bakteriler, birbirleriyle olan benzerlikleri, kullandıkları substrat (CMY=Sefamisin, MOX=Moksolaktam, FOX=Sefoksitin,

LAT=Latamoksef), izolasyon yerleri (DHA; Dhahran Hastanesi, MIR; Miriam Hastanesi), beta laktamin tipi (ACT; AmpC tipi, ACC; Ambler Class C), hatta hasta isimlerine (BIL-1; Bilal isimli bir hastadan izole edilen enzimdir.) göre adlandırılan çeşitli enzimlerden oluşurlar (9, 22, 37). Bu enzimlerden bazılarının birden fazla adı bulunmaktadır. Örneğin CMY-2 aynı zamanda BIL-1 yada LAT-2 olarak, LAT-1 LAT-4 olarak, CMY-6 ise LAT-3 olarak adlandırılmışlardır (9, 37).

CMY-2a, -2b, -3, -4a, -4b, -5, -6, -7, LAT-1, -2, -3, -4, BIL-1 subgrup C₁'de bulunmakta ve bu enzimler *C. freundii*'nin kromozomal AmpC beta laktamazı ile %89.2-97.1 benzerlik göstermektedirler (çizelge.2.4). Bret ve ark (38) yaptıkları çalışmalarla bu subgruba ait olan CMY-3 enziminin *Proteus mirabilis* tarafından kromozomal olarak üretildiğini belirlemişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu enzimin C₁ ailesindeki enzimler ve *C. freundii*'nin AmpC beta laktamazları ile kuvvetli benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarla bu benzerliğin bir genustan diğerine *ampC* geninin transpozonlarla aktarılması sonucu mümkün olabileceği gösterilmiştir. ABD'deki subgrup C₁ tipi AmpC beta laktamazlar Dunne ve ark (39) tarafından seftriakson dirençli *Salmonella* infeksiyonlarının doğal surveyansı sırasında bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda çoklu direnç gösteren *Salmonella spp.* çoğunlukla serovar Typhimurium, insanlardan ve evcil hayvanlardan izole edilmiş ve bu izolatların tümünün plazmid kaynaklı CMY-2 kodladığı belirlenmiştir (40, 41).

Subgrup C₂ ya da CMY-1 grubunda bulunan enzimler, C₁ sub grubundaki enzimlerden daha az benzerlik gösterirler. CMY (CMY-1, -8, -9, -10, -11) ve MOX (MOX-1, -2) enzimleri ile, FOX varyantları (FOX-1, -2, -3, -4, -5, -6) olarak iki alt kümeye ayrılırlar (çizelge.2.4). *E. aerogenes* türlerinde plazmid kaynaklı CMY-10 varlığı ilginçtir. Çünkü bu türler normalde kromozomal AmpC geni taşırlar. Subgrup C₂ beta laktamazlar *P. aeruginosa*'nın AmpC beta laktamazı ile ilişkilidir. *Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria*'nın kromozomal AmpC beta laktamazları ile subgrup C₂ enzimleri arasında ise aynı düzeyde ilişki bulunmaktadır. Bu beta laktamazlar arasında filogenetik olarak çok yakın akrabalık gösterilmiştir. Subgrup C₂ beta laktamazlarla *Aeromonas spp.*'nin AmpC beta laktamazları arasında %65.9-78.7 benzerlik görülmesine karşın, *P.*

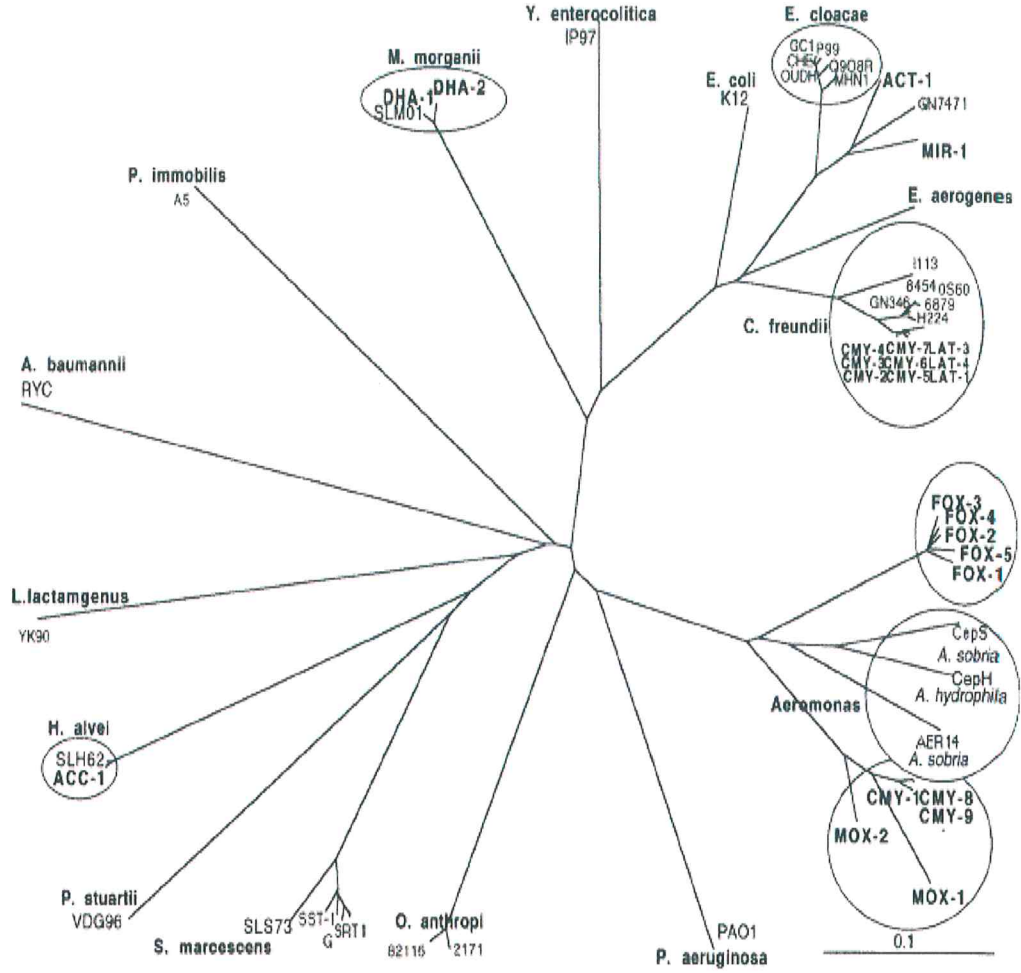
aeruginosa'nın sınıf C beta laktamazları ile %49.6-53.4 benzerlik bulunmaktadır (3). Bu durum subgrup C₂ enzimlerinin her iki mikroorganizmadan da köken aldığını, ancak *Aeromonas* AmpC beta laktamazları ile yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda subgrup C₂'de yer alan *bla*_{CMY-10} geninde *bla*_{CMY-1} geninden farklı olarak bir nokta mutasyon görüldüğü, *bla*_{CMY-11} geninde ise *bla*_{CMY-1} geninden farklı olarak iki nokta mutasyon bulunduğu saptanmıştır. *bla*_{CMY-1} geni *bla*_{CMY-8} ile %97.9, *bla*_{CMY-9} ile %97.8 benzerdir ve bu genler arasındaki farklılık 24 ve 25 bazlık bir bölümden kaynaklanmaktadır. *bla*_{CMY-8} ve *bla*_{CMY-9} genleri arasında ise tek bazlık bir değişiklik bulunmaktadır (3).

Subgrup C₃'de bulunan ACT-1 ve MIR-1 beta laktamazları *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında saptanmıştır (14, 42). ACT-1 indüklenabilir yapıda olan plazmid kaynaklı enzimlerdendir. Subgrup C₃ enzimleri *E. cloacae*'nin AmpC beta laktamazları ile %85-91.1 benzerlik göstermektedirler. *Enterobacter asburiae*'nin beta laktamazları ile ACT-1 %97.6, MIR-1 %92.9 oranında benzerdirler (3) (çizelge.2.4). İlk kez 1997 yılında Bradford ve ark (14) çalışmaya aldıkları izolatların kromozomlarında *bla*_{ACT-1} geninin varlığını göstermişler, fakat bazı *K. pneumoniae* suşlarında ise bu genin plazmidler üzerinde bulunduğunu belirlemişlerdir.

Subgrup C₄'de bulunan AmpC beta laktamazlar *Salmonella enteritidis*'de saptanmış olan DHA-1 ve *K. pneumoniae*'da bulunan DHA-2'dir. Plazmid aracılı DHA beta laktamazlar *M. morgani*'nin AmpC beta laktamazlarından köken almaktadırlar (çizelge.2.4). DHA-1 ve DHA-2 beta laktamaz enzimleri de ACT-1 gibi indüklenabilir yapıda olan plazmid kaynaklı enzimlerdir. Çünkü *ampR* genleri de bu enzimlerin genleri ile birlikte plazmidlerle aktarılmaktadır (3).

Subgrup C₅'de *K. pneumoniae*'nin klinik izolatlarından identifiye edilen ACC-1 beta laktamazi bulunmaktadır. ACC-1 enzimi *H. alvei*'nin kromozomal AmpC beta laktamazından köken almakta ve bu enzim ile %99.7 benzerlik göstermektedir (3) (çizelge.2.4). İki enzim arasındaki fark, peptid dizisindeki tek aminoasit değişikliğinden kaynaklanmaktadır. ACC-1 enzimi üreten suşlar sefamisinlere duyarlıdır. Şekil.2.3'deki dendogramda kromozomal ve plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz enzimlerinin aralarındaki ilişki

gösterilmiştir.



Şekil.2.2. Kromozomal ve plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz enzimlerinin aralarındaki ilişkiyi gösteren Clustal X ile hesaplanarak hazırlanmış dendrogram (9).

Enterobacteriaceae ailesinin bazı üyelerinin (*E. coli*, *E. aerogenes*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *Y. enterocolitica* vb) kromozomal ve plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazları arasındaki benzerlik %32.6-78.2 arasında değişmektedir.

Yapılan pek çok çalışma ile AmpC genlerinin farklı genuslar arasında transferinin transpozonlar aracılığı ile de olabileceği gösterilse de, AmpC genleri genellikle diğer direnç genleriyle birlikte aynı plazmid üzerinde taşınırlar ve bu nedenle sıklıkla bu suşlar, çoklu direnç özelliği gösterirler (22). Böylece bir bakterinin plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazının olması laboratuvarında tanısal problemlere ve tedavide sorunlara yol açabilmektedir.

2.3. AmpC Beta Laktamazların Hidrolitik ve İnhibitör Özellikleri

Gram negatif mikroorganizmalar örneğin *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* yüksek düzeyde kromozomal AmpC beta laktamaz üretirler ve karbapenemler, 4. kuşak sefalosporinler dışında, beta laktamaz inhibitörleri taşıyanlarda dahil olmak üzere, hemen hemen tüm beta laktam antibiyotiklere dirençlidirler. Ancak Barnaud ve ark (43) 2001 yılında klinik *Enterobacter cloacae* CHE AmpC beta laktamaz enziminin, Mammeri ve ark (44) 2003 yılında delesiya uğramış *S. marcescens*'in kromozomal AmpC beta laktamaz enziminin klinik izolatlarda sefepimi inaktive ettiklerini saptamışlardır.

Aşırı miktarda kromozomal AmpC beta laktamaz üretimi, indüklenebilir *ampR*'nin *ampC* gen transkripsiyonunu regüle etmesi nedeniyle olmaktadır. Plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz sentezleyen bakterilerde görülen direnç paternleri, kromozomal enzim kodlayan mikroorganizmalarınki ile benzerdir. Plazmidle kodlanan AmpC beta laktamazların sentezi *ampR* ile regüle edilmez, çünkü çoğu suşda *ampR* geni plazmidle aktarılamamıştır. Sadece ACT-1, DHA-1 ve DHA-2 beta laktamazların sentezi, *ampR* geni plazmidle aktarılabildiği için indüklenebilir. Bu enzimlerin dışındaki plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazların sentezi sürekli dir. Plazmid üzerinde birkaç genin bulunması, yüksek kopya sayısında plazmid olması ya da çok sayıda potent promotör olması nedeniyle, plazmid aracılı beta laktamazlar yüksek düzeyde üretilebilirler. Sadece *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)'nın *bla_{CMY-5}* geni zayıf eksprese edilir, çünkü plazmid kopya sayısı azdır. AmpC beta laktamazlar fonksiyonel grup 1 beta laktamazlar olarak sınıflandırılırlar ve sefalosporinazdırlar. Klasik sefalosporinleri (sefalotin, sefaloridin) hidroliz etme oranları (V_{max}), penisilinlerden yüksektir. Bununla birlikte grup 1 sefalosporinazlar penisilinleri de oldukça etkin bir şekilde hidroliz ederler, ancak K_m değerleri düşüktür. AmpC beta laktamazlardan FOX-1, FOX-4 ve MOX-1 enzimlerinin sefoksitin ve moksolaktam hidrolizi, sefaloridin substrat seçildiğinde, sefaloridine göre daha güçlüdür. Böylece yavaş hidroliz oranları (düşük V_{max} değerleri), enzimlere yüksek affiniteleri (düşük K_m) ile kompanse edildiğinde sonuçta beta laktamlara direnç gelişebilmektedir (3).

Grup 1 sefalosporinazlar, inhibisyon sabiti (IC_{50}) çok yüksek olan klavulanat, *p*-kloromerküribenzoat, divalen metal iyon şelatörlerinden EDTA ve

o-phenanthroline etkisizdir. Bununla birlikte enzimler, *P. mirabilis*'in CEP-1 beta laktamazı dışında, kloksasilinin düşük konsantrasyonlarına yüksek duyarlılıktadırlar.

Penisilanik asit sülfonlarından tazobaktam ve sulbaktamın, monobaktamlardan aztreonamın bazı AmpC beta laktamazları inaktive etme özellikleri vardır.

AmpC beta laktamaz üreten Gram negatif bakteri izolatları genellikle imipeneme duyarlıdır. İmipeneme direnç gelişiminde dış membran protein kaybı tek başına veya AmpC beta laktamazların aşırı üretimi ile birlikte görülebilir. Çeşitli çalışmalarda imipenem direnci, plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz salgılayan suşlarda gösterilmiştir (14, 45, 46).

2.4. *ampC* ile Kodlanan Genlerin Yayılımı

Kromozomal *ampC* genlerinin mobilizasyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, *ampC* genlerinin kazanılması genellikle plazmidler ve transpozonlar aracılığı ile olmaktadır. Plazmidler ve transpozonlar, türler ve genuslar arası alıcı bakteriye transkonjugasyon ile horizontal gen transferine neden olan, bilinen en mobil, epizomal DNA elementleridir. Beta laktamazları kodlayan plazmid kaynaklı *bla* genleri, moleküler sınıf A, B ve D'ye ait, transpozon ve integronlar içerisinde yer alan gen kasetleridir. Plazmidle kodlanan *ampC* genleri arasında, *bla*_{MOX-1}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-8}, *bla*_{CMY-9}, *bla*_{FOX-1}, *bla*_{DHA-1} genleri sınıf 1 *sull* tip integron *In6* ve *In7* ile ilişkilidirler. Böylece *bla*_{CMY-1} subkümesinin pek çok son üyesi, *bla*_{CMY-10} ve *bla*_{CMY-11} genleri de bu integronla ilişkilidirler. Bununla birlikte bu genlerin hiçbirisi tipik gen kasetlerinde taşınmazlar, çünkü 59 bazdaki karakteristik özelliklerin tümüne sahip değildirler. *E. coli*'nin ve *K. oxytoca*'nın plazmid kaynaklı genleri *bla*_{CMY-4} ve *bla*_{CMY-5} ile *P. mirabilis*'in kromozomal *bla*_{CMY-3} geni insersion *ISEcp1* ile ilişkilidirler. *ISEcp1*'den kesit alındığında *bla*_{CMY-2}'nin üst bölgesinde *tnpA* geninin 3' ucu ve IR-R yer alır. *bla*_{LAT-1} üst dizilerinde tam IR-R verileri taşınırken, *bla*_{BIL-1} üst dizilerine IR-R'nin sadece bir bölümü tutunmaktadır. Böylece dizinin olmaması nedeniyle *bla*_{CMY-3}, *bla*_{CMY-4} ve *bla*_{CMY-5} genleri hariç, genetik organizasyonda birbirine çok yakın *bla* üst bölgeleri çoğunlukla bilinmez. Tüm subgrup C₁ *ampC* genlerinde *ISEcp1*'in ortak

olup olmadığı sekans özellikleri ile gösterilebilir. *bla*_{MOX-2} üst dizilerinde *IS186*'nın *tnpA* genini taşır ve *bla*_{MIR-1} *Tn5501* transpozonunun *tnpA* genini içerir. Her iki *bla*_{ACC-1} genide *ampC* genlerinden yukarıda lokalizedirler hem de *tnpA* genine bağlıdır (3).

Çoğunlukla plazmidle kodlanan *ampC* genleri, aktarılabilen plazmidler üzerinde bulunurlar. Sadece birkaç tanesi kendi kendine aktarılamayan plazmidler üzerinde bulunurlar. Konjugatif ya da direnç plazmidleri gibi plazmidler hareketli olabilirler. Halen direnç genlerinin transferi ile ilgili en çok kabul edilen mekanizma konjugatif transpozonlar ya da plazmidler aracılığıyla konjugasyondur. İntestinal sistem gibi mikroorganizmaların doğal yerleşim bölgelerinde verici bakterilerden alıcı bakterilere, *ampC* genleri aktararak da direnç plazmidleri kazanılabilir. Bu varsayım çeşitli gözlemlerle doğrulanmıştır. Hastanede yatan hastalardan çoklu dirençli *E. coli* suşları izole edilmiş ve bu türlerde VEB-1 plazmidle kodlanan sınıf A beta laktamaz bulunduğu saptanmıştır (47). Araştırmacılar hastada çoklu dirençli bakteri için rektal kültür olarak *E. coli* suşlarındakine benzer plazmid taşıyan *K. pneumoniae* suşu izole etmişlerdir. Plazmid kaynaklı ACC-1 beta laktamaz üreten *P. mirabilis*'in izolasyonundan sonra, Girlich ve ark (48) hastalarından rektal kültür almışlar ve *P. mirabilis*'in plazmidini ile benzer özellikli plazmid taşıyan *E. coli* izolatu bulmuşlardır. Archambaud ve ark (49) barsakta *K. pneumoniae* ve *Salmonella kedongou* arasında plazmidlerin transfer edildiğini saptamışlardır.

AmpC genleri şimdilik Gram negatif patojenler arasında aktarılmaktadırlar. Önceden bazı türlerde *ampC* genlerinin bakteriyel kromozomlar içerisinde bulunduğu bilinmiyordu. Gelecekte *Enterobacteriaceae*'nin plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazlarının tedavide sorun yaratacağı düşünülmektedir. Eğer *ampC* genleri Gram negatif bakterilerin TEM-1 ve TEM-2 gibi yaygın plazmidle kodlanan beta laktamazlarına özgü transpozonlar ile yakalanırlarsa, plazmid aracılı *ampC* genlerinin insidansı dramatik olarak artabilir (3).

2.5. Epidemiyoloji

1989 yılından bu yana plazmid aracılı AmpC beta laktamazlar tüm dünyada artan sıklıkta tanımlanmaya başlamıştır. Farklı coğrafik bölgelerden

farklı enzim gruplarının daha sık olarak bildirilmesi dikkat çekicidir. Örneğin Kuzey Amerika'da MIR-1 ve ACT-1, Orta ve Güney Amerika'da FOX-1 ve FOX-2, Asya'da CMY-1 ve MOX-1, Akdeniz ve Orta Doğu'da CMY-2, CMY-2b, LAT-1 ve LAT-2, Güney Kore'de ise DHA-1 ve CMY-1 enzimleri sık görülmektedir (9, 23). Yapılan çalışmalarda seyahat ile ülkelerarası AmpC enzimlerinin transfer edilebildiği de belirlenmiştir (46, 48).

Son zamanlarda çeşitli şehirlerde yapılan çok merkezli çalışmalarda *K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin nozokomiyal infeksiyonlara da neden olduğu saptanmıştır. ABD'de yapılan çalışmalarda *E. coli* suşları %12.5 oranında, *K. pneumoniae* suşları %17.7 oranında sefoksitine dirençli bulunmuş ve bu suşların plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz salgıladıkları belirlenmiştir (50). Kore'de ise *K. pneumoniae* suşlarının %15'i sefoksitine dirençli, plazmidle kodlanan CMY-1 benzeri sefalosporinaz taşıyan suşlar olarak tanımlanmıştır (51). Bu tip plazmid aracılı sefalosporinaz ilk kez Güney Kore'de saptanmıştır (12). Daha sonra yapılan çalışmalarla CMY-1 benzeri enzimlerin *E. coli*'ye yayıldığı belirlenmiştir (52). Yunanistan'da Atina Hastanesi'nde *E. coli* suşlarının %3'ünde LAT ailesine ait enzimlerin neden olduğu sefoksitin direnci saptanmıştır (53). Batı ve Güney Avrupa ülkelerinde yapılan surveyans çalışmalarında; Hollanda'da AmpC beta laktamaz üreten *K. oxytoca* suşları, İtalya'da AmpC beta laktamaz üreten *K. oxytoca* ve *K. pneumoniae* izolatları bulunmuştur (54). Bu AmpC benzeri beta laktamazların *M. morgani*'nin kromozomal AmpC beta laktamazları ve plazmid kaynaklı subgrup C₄ ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. ABD'de Steward ve ark (55) yaptıkları çalışmada 139 *K. pneumoniae* suşunun 6'sında AmpC benzeri beta laktamaz saptamışlar ve PCR testleri ile bu enzimlerin *E. cloacae*'nin AmpC beta laktamaz enzimi ile genetik olarak ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Tayvan'da ise *K. pneumoniae* izolatlarında subgrup C₂ beta laktamaz CMY-8 üreten üç tür saptanmıştır (56). Bu türlerin pulsed field jel elektroforez (PFGE) paternleri ve plazmid profilleri benzer bulunmuştur. Horton ve ark (57) tarafından ABD'deki suşlar arasında yüksek düzeyde AmpC üreten *S. enterica* serovar Heidelberg suşu bulunmuştur. Bu genler klonlanmadığı ve sekanslanmadığı için plazmid kaynaklı AmpC enzimlerinin coğrafik yayılımı ya da beta laktamazların yeni subgrupları temsil edip etmediği belirlenememiştir.

SHV-2 ya da SHV-5 benzeri GSBL üreten türlerde olduğu gibi yolculuk ve hastaların transferinin AmpC beta laktamazların ülkelerarası yayılımına neden olabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (9). Avrupa’da plazmid aracılı AmpC beta laktamaz taşıyan patojenik bakterilerde direncin aktarılmasının seyahatler yoluyla uluslararası düzeylerde olabileceği saptanmıştır. Ciddi yanıklı bir hastadan izole edilen *E. coli*’nin BIL-1 sefalosporinazının Pakistan’dan İngiltere’ye taşındığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (58). M’Zali ve ark (59) çalışmalarında Hindistan’dan İngiltere’ye *E. coli* türlerinde bulunan subgrup C1 beta laktamazların getirildiğini belirtmişlerdir. Cao ve ark (46) İsveç’de de benzer bir durumu saptamışlardır. Hindistan’a giden ve bu sırada antibiyotik tedavisi alan hastada 6 hafta sonra çoklu direnç gösteren *K. pneumoniae* suşu izole etmişler ve bu mikroorganizmanın plazmidle kodlanan CMY-4 beta laktamazı taşıdığını belirlemişlerdir. Fransa’da yapılan bir çalışmada yurtiçi kökenli olmayan plazmidle kodlanan AmpC beta laktamazlar belirlenmiştir. Bu çalışmada *Salmonella senftenberg* ve *E. coli* izolatlarının plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazlarının her ikisinin de subgrup C1’e ait olduğu saptanmıştır (60). Nadjar ve ark (16) 1998 yılında Tunus’dan Paris’deki bir hastaneye gönderilen bir hastada sonradan çoklu direnç gösteren *K. pneumoniae* izole etmişlerdir. Tüm önlemler alınmış olmasına rağmen, diğer hastalarda benzer *K. pneumoniae* suşları ile infekte olmuştur. Nadjar ve ark (16) izolatların tamamında, daha önceden Almanya’da Bauernfeind ve ark (61) tarafından bulunan ACC-1 tipi AmpC beta laktamazını saptamışlardır. Fransa ve Almanya’da izole edilen bakterilerin muhtemel klonal orjinleri farklı olmakla beraber tamamen plazmid kaynaklı beta laktamazlardır. Girlich ve arkadaşları da (48) plazmid kaynaklı ACC-1 beta laktamaz üreten bir bakteriyi Tunus’dan Fransa’ya gelen bir hastadan izole etmişlerdir. Ardından aynı hastadan beta laktamaz salgılayan *P. mirabilis* ve *E. coli* suşları da saptanmıştır. Diğer çalışmalarda da Guatemala’dan Almanya’ya (FOX-2), Yunanistan’dan Fransa’ya (MOX-2), Punjab’dan Londra’ya (CMY-2, CMY-6, CMY-7) pek çok suşun seyahatler yoluyla taşındığı belirlenmiştir (9, 62).

Plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz taşıyan bakteriler seyahat eden insanlarla yayılabildiği gibi vektörler ve hayvansal gıdalarla da yayılabilirler. ABD’de Winokur ve ark (63) insanlardan ve evcil hayvanlardan izole ettikleri *E.*

coli ve *Salmonella* suşlarını incelemişler, insanlar ve evcil hayvanlar arasında çok sıklıkla bakteri transferinin olduğunu, *E. coli* ve *Salmonella* arasında da plazmidlerin aktarılabildiğini göstermişlerdir.

Plazmid aracılı AmpC beta laktamaz enzimlerinden olan CMY-2'nin prevalansı yüksek olduğu gibi, coğrafik olarak da geniş bir alana yayılım göstermektedir. Cezayir, Fransa, Almanya, Yunanistan, Hindistan, Pakistan, Tayvan, Türkiye, İngiltere ve ABD CMY-2'nin bildirildiği ülkelerdir (9, 64).

Hindistan ve Kuzey Afrika'dan Avrupa'ya plazmidle kodlanan beta laktamaz taşıyan bakteri transfer tanımlamaları, o bölgelerde plazmidle kodlanan *ampC* gen kaynaklarının olabileceğini göstermektedir.

Salmonella türleri ve *K. pneumoniae* izolatları dışındaki plazmid kaynaklı AmpC enzimi üreten çoğu suş, öncesinde hastanede kalış öyküsü olan hastalardan izole edilmektedirler. Yapılan çalışmalar bu kişilerin sıklıkla uzun süreli yoğun bakım tedavisi almış hastalar olduğunu göstermiştir. Hatta bazı hastaların bir ya da daha fazla sayıda cerrahi müdahale yapılmış, karaciğer veya böbrek nakli uygulanmış, lösemi, kanser gibi hastalıkları olan immun direnci düşük bireyler olduğu belirlenmiştir (13, 15, 45, 59, 65). Organizmaların idrar (izolatların yaklaşık %50'si), kan, balgam, yara ya da dışkı kültürlerinden izole edilebildiği, bazı izolatların ise diğer potansiyel patojenlerle birlikte karışık kültürlerden izole edildiği saptanmıştır. Hastaların çoğunda, sefoksitin, moksalaktam, sefmetazol, sefotetan, imipenem gibi beta laktam antibiyotikleri kullanma öyküsünün olduğu belirlenmiştir (13, 14, 65, 66). Plazmid kaynaklı AmpC enzimi olan pek çok mikroorganizmanın aynı zamanda TEM-1, TEM-2, hatta SHV-5 gibi GSBL enzimlerini de üretebildiği gösterilmiştir (53, 59, 67). Bu durumun AmpC enziminin hastalar arasında yayılımında önemli olabileceği düşünülmektedir.

Beta laktamazların evrimi antibiyotiklerin rastgele kullanımının bir sonucu olarak değerlendirilmektedir.

2.6. AmpC Beta Laktamazların Tanımlanması

AmpC beta laktamazların saptanmasında CLSI'nın önerisi bulunmamaktadır (4). Ancak bu enzimlerin tanımlanmasında çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılabilmektedir.

Fenotipik yöntemlerden olan duyarlılık testleri ile tazobaktam, sulbaktam, klavulonat, aztreonam, sefotaksim, seftazidim, sefpodoksim ve sefoksitin gibi antibiyotiklere direncin gözlenmesi, o mikroorganizmanın AmpC beta laktamaz enzimi ürettiyor olabileceğini düşündürmelidir. Duyarlılık testleri ile bu enzimin varlığından şüphelenilen suşlara, boronik asit disk test, cefoxitin-hodge test, üç boyutlu test, cefoxitin agar medium (CAM) testi, AmpC disk test, izoelektrik odaklama gibi fenotipik testler yapılabilmektedir (68, 69, 70, 71). Fakat bu testler günümüzde henüz iyi standardize edilmiş yöntemler değildir.

AmpC enzim tipini belirlemek için moleküler yöntemlere gereksinim vardır. Polimeraz zincir reaksiyonu günümüzde beta laktamaz genlerini saptamada en sık ve en yaygın kullanılan moleküler yöntemdir. Ancak bu yöntemle sadece enzimin bağlı olduğu aile saptanabilmektedir.

DNA dizi analizi, beta laktamazlara ait genlerdeki nükleotid değişikliklerinin tam olarak saptanabildiği, diğer direnç genleri gibi plazmid kökenli AmpC beta laktamazların da tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen yöntemlerdendir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 12.01.2006 tarihinde (Etik kurul onam no: B.30.2.AKD.0.01.00.00/Etik-06) onam verilmiştir.

3.1.1. Bakteri suşları

Ocak 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Kültür Birimi'nde klinik örneklerden izole edilen 1398'i *E. coli* ve 502'si *Klebsiella spp.* olmak üzere toplam 1900 suş çalışmaya alınmıştır.

Suşlar, Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize bakteri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi ile konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Phoenix 100 sistemi ile sefoksitine az duyarlı veya dirençli olduğu saptanan 53 suşun sefoksitin duyarlılıkları, disk difüzyon yöntemiyle tekrarlanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan toplam 41 *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatının saf kültür halindeki pasajları daha sonraki çalışmalar için boncuklu stok tüplerinde stoklanarak -20 °C'de saklanmıştır.

Çalışmanın yapıldığı tarihler arasında klinik örneklerden izole edilen *P. mirabilis* izolatlarından hiçbirisi sefoksitine dirençli bulunmamıştır. Bu nedenle bu suşlar çalışma dışı bırakılmıştır.

3.1.2. Ayraçlar

1- EDTA (ethylenediaminetetraacetate) (Sigma E5134)

	<u>0.5 M</u>	<u>0.2 M</u>
Na ₂ EDTA	18.6 g	7.44 g
Distile H ₂ O	100 ml	100 ml

EDTA pH 8.0'da erir. 1-2 g NaOH pelleti ile istenen pH elde edilerek otoklavlanmıştır.

2- TBE (10X)

Tris base (Sigma T6066)	108 g
Boric acid (Sigma B6768)	55 g
0.5 M EDTA	40 ml

Distile su 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

Oda ısısında 1 ay stabildir.

3- Agaroz (Sigma A5093)

4- Etidium bromide (Amresco 0492-Q)

5- Jel yükleme tamponu (Sigma G2526)

6- dNTP karışımı (100 mM her biri) (Bioron 110011)

(2,5 mM / herbiri, toplam 10 mM)

dATP (100 mM) 25 µl

dCTP(100 mM) 25 µl

dGTP(100 mM) 25 µl

dTTP (100 mM) 25 µl

Distile su 900 µl

-20 °C'de saklanmıştır.

7- Marker'lar:

GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermentas SM0371)

IEF Standart 4.45-9.6 (Biorad 161-0310)

8- FastStart Taq DNA Polimeraz (Roche) 5 U/µl

İçeriği:

10X PCR buffer

25 mM MgCl₂

9- Fosfat tamponu 0,1 M pH 7.0

A- 0,2 M sodyum fosfat, mono-sodyum tuzu

13,8 g NaH₂PO₄-1 H₂O (MW=138) distile suda çözülüp, 500 ml'ye tamamlanmıştır.

B- 0,2 M sodyum fosfat, di-sodyum tuzu

26,81 g Na₂HPO₄-7 H₂O (MW=268,1) distile suda çözülüp, 500 ml'ye tamamlanmıştır.

A (39 ml) + B (61 ml) + distile su (100 ml) şeklinde karıştırılmıştır.

10- Nitrosefin (Oxoid SR112C), 1 mg

Kendi çözücüsü içinde (Fosfat tamponu + DMSO) sulandırılmıştır (500 µg/ml).

11- Poliakrilamid jel

- Monomer konsantrat (T= % 25, C= % 3)

Acrylamide (Sigma A 8887) 30 g

Bis (N,N'-Methylene-bis-acrylamide) (Sigma M 7256) 0,8 g

Distile su içerisinde çözdürülerek final volüm distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra solüsyon 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Balon jojenin etrafı alimünyum folyo ile kaplanarak +4 °C'de saklanmıştır (1 ay stabildir.).

- TEMED (N, N'-Tetramethylene-ethylenediamine) (Fluka 87689)

500 µl TEMED içerisine 9,5 ml distile su ilave edilerek %5'lik solüsyonu hazırlanmıştır.

- % 40 Ampholyte (Bio-lyte 3/10) (Biorad 163-1112)

- % 10 (w/v) Ammonium persulfate (Merck 1.01201.0100)

0,1 g ammonium persulfate 1 ml distile suda çözdürülür. Solüsyon kullanımından hemen önce günlük olarak hazırlanmıştır.

- % 87 gliserol (w/v)

87 g gliserole distile su eklenerek final volum 100 ml olacak şekilde karıştırılmıştır.

125 x 65 x 0.4 mm boyutlarında iki adet poliakrilamid jel hazırlamak için monomer-ampholyte solüsyonu ve catalyst solüsyonları 50 ml'lik falcon içerisinde karıştırılmıştır.

distile su	9.5 ml	}	Monomer-ampholyte solüsyonu
monomer konsantrat	4.3 ml		
% 87 gliserol	2 ml		
% 40 ampholyte	1 ml		

% 10 ammonium persulfate	425 µl	}	Catalyst solüsyonu
% 5 TEMED	250 µl		

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık testi

Laboratuvara gönderilen tüm örneklerden soyutlanan ve Phoenix 100

sistemi ile sefoksitin dirençli (MIK ≥ 32 µg/ml) ya da az duyarlı (MIK ≤ 8 µg/ml) saptanan suşların, CLSI'nın önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ampisilin (10 µg), ampisilin-sulbaktam (20 µg), amoksisilin-klavulanat (30 µg), piperasilin-tazobaktam (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), sefoksitin (30 µg), seftazidim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefaperazon-sulbaktam (105 µg), sefepim (30 µg), aztreonam (30 µg), levofloksasin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg) ve trimetoprim-sulfametaksazol (1,25/23,75 µg) duyarlılıkları saptanmıştır. Bunun için mikroorganizmaların kanlı agardaki bir gecelik taze pasajlarından 0.5 McFarland'lık süspansiyon hazırlanarak Mueller Hinton agara (Oxoid, İngiltere) yayılmıştır. Agar üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilerek 35 °C'lik etüvde bir gece bekletilmiş, ertesi gün mikroorganizmaların zon çapları kaydedilmiş ve CLSI'nın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Suşlardan sefoksitin zon çapı ≤ 14 mm olanlar sefoksitine dirençli, 15-17 mm arası olanlar sefoksitine az duyarlı olarak belirlenmiştir. Sefoksitin zon çapı ≥ 18 mm olan suşlar ise sefoksitine duyarlı olarak değerlendirilerek çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2.2. Kombine disk yöntemi

Yüksek düzeyde AmpC beta laktamaz üreten suşlarda, GSBL üreten suşlardan farklı olarak sefamisinlere direncin gözlenmesinin yanı sıra, ortaya çıkan direnç; klavulanat, sulbaktam, tazobaktam ile kombine beta laktam ilaçlarla da inhibe edilememektedir.

AmpC beta laktamazların saptanmasında CLSI'nın önerisi bulunmamasına karşılık, GSBL enzimlerinin saptanmasında çeşitli fenotipik tarama ve doğrulama testlerinin kullanılması önerilmektedir. CLSI, sıvı mikrodilüsyon testi ile üçüncü kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin (sefotaksim, seftazidim, sefpodoksim, seftriakson) MİK değerinin ≥ 2 µg/ml olarak saptandığı durumlarda ya da disk difüzyon testi ile seftazidim ve sefpodoksim inhibisyon zon çaplarının ≤ 22 mm, aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının ≤ 27 mm, seftriakson zon çapının ≤ 25 mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmasını önermektedir.

Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı

olma özelliğinden faydalanılmaktadır. Kombine disk yöntemi ile üç boyutlu test sık olarak kullanılan doğrulama testlerindendir.

0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller Hinton agarı kombine disk yöntemi için, klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. 35°C’de bir gece inkübasyondan sonra, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (4).

3.2.3. Üç boyutlu test

Üç boyutlu test, AmpC beta laktamazların saptanmasında kullanılan fenotipik yöntemlerden birisidir. Testin uygulanışı sırasında hücreden enzimin ekstraksiyonuna gerek duyulduğu için Modifiye Hodge teste göre daha zor olmasına rağmen, yalancı pozitiflik oranının daha az olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan suşlara, Coudron ve arkadaşlarının önerileri doğrultusunda üç boyutlu test yöntemi uygulanmıştır (68).

Bakterilerin kanlı besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından hazırlanan 0,5 McFarland’lık süspansiyonları Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerine ekilerek dört saat 35 °C’lik etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözülürken enzim ekstraksiyonu yapılmıştır. Standart disk difüzyon testi için Mueller Hinton agarı ATCC 25922 *E. coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulmuştur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılmış ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µl elde edilen enzimlerden konulmuştur. Petriler 35 °C’lik etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan 3 mm’ye eşit ve 3 mm’den fazla distorsiyona neden olanlar “üç boyutlu test pozitif” olarak kabul edilmiştir.

3.2.4. İzoelektrik odaklama (Isoelectric Focusing; IEF) yöntemi

İzoelektrik odaklama, proteinlerin ayırımında yaygın olarak kullanılan, sabitlenmiş bir pH gradientinde gerçekleşen elektroforez olarak tanımlanan bir yöntemdir. Proteinler sahip oldukları yüke göre anod veya katoda göç ederler, net

yükleri sıfır olduğunda ise sabit kalarak yoğunlaşırlar ve bant oluştururlar. Sabit kaldıkları nokta “izoelektrik nokta” (pI) veya “izoelektrik pH” olarak tanımlanır.

3.2.4.1. Beta laktamaz eldesi

Çalışmamızda, AmpC beta laktamazların izoelektrik noktalarını belirlemek amacıyla yarı otomatize bir elektroforez sistemi olan "Model 111 Mini IEF Cell" cihazı (Biorad, Hercules, Kaliforniya) kullanılmıştır. Beta laktamaz eldesi için suşlara sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için suşların kanlı agar besiyerlerindeki bir gecelik taze pasajlarından 10 ml TSB besiyeri içerisine bol miktarda ekim yapılmış ve tüpler 35 °C’de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş, üstteki süpernatant atılarak buz üzerinde 1 ml distile su ile resüspanse edilmiştir. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Örnekler 5000 rpm’de 5 dakika daha santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant atılmış ve 1 ml fosfat tampon eklenerek 10 dakika 5000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Sonikasyon işlemi için sonikatör (Bandelin Sonopuls, Berlin) probu tüp içine daldırılarak 70 V’da 15’er saniyelik 3 işlem ile bakteriler parçalanmıştır. Elde edilen sonikat, +4 °C’de 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş, beta laktamazları içeren üst sıvı toplanmış ve -20 °C’de saklanmıştır.

Sonikasyon sonucu elde edilen üründe beta laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile saptanmıştır. 30 µl ürün, 100 µl nitrosefin çözeltisi (1/10 sulandırılmış) ile karıştırılmış, enzimin nitrosefinde bulunan beta laktam halkasındaki amid bağı parçalamasıyla rengin sarıdan kırmızıya dönüşmesi olumlu olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi olmayan ve renk değişim süresi 5 dakikayı aşan örnekler için sonikasyon işlemi tekrarlanmıştır. Ayrıca her enzim için renk değişim süreleri kaydedilmiş, izoelektrik odaklama yönteminde aynı sürelerle sahip örnekler bir arada incelenmiştir.

3.2.4.2. Poliakrilamid jel hazırlama

Jel destekleyici filmin hidrofobik yüzeyi bir miktar distile su yardımı ile cam plağa yapıştırılarak jel dökme aparatı üzerine yerleştirilmiştir. Daha önceden hazırlanan poliakrilamid jel, jel destekleyici filmin hidrofilik yüzeyi ile jel dökme aparatı arasına pastör pipeti yardımıyla yayılarak floresan ışık altında yaklaşık bir saat kurumaya bırakılmıştır. Jel, ince bir spatula yardımıyla jel dökme

aparatından, destekleyici film ve cam plak ile birlikte kaldırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.4.3. Elektroforez

Jel üzerine yerleştirilen aplikatör striplere her birinden 0,5'şer µl olacak şekilde örnekler ve IEF standardı konularak birkaç dakika beklenmiş, jele zarar vermeden aplikatör strip kaldırılmış ve ardından jel Model 111 Mini IEF Cell cihazına yerleştirilerek, 100 V'da 5 mA'de 0.5 W'da 15 dakika, 200 V'da 5 mA'de 1W'da 15 dakika, 450 V'da 4 mA'de 1.8 W'da 60 dakika olmak üzere toplam 90 dakika beta laktamaz içeren ürünler yürütülmüştür. Bu süre sonunda 0.1 M fosfat buffer içerisinde 0.5 mM nitrosefin çözeltisi (500 µg/ml) eklenip jel üzerine yayılarak enzim bantları görünür hale getirilmiştir. Enzimlerin izoelektrik noktaları protein marker IEF Standart 4.45-9.6 ile karşılaştırılarak saptanmıştır. İzoelektrik noktaları 6.4-9.4 arasında olup, plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazlarla uyumlu olduğu düşünülen ürünler ile, izoelektrik noktaları TEM (pI 5.2-6.5), SHV (pI 7-8.2), CTX-M (pI 7.9-8.6) türevi GSBL'lar ile uyumlu bulunan ürünler scanner yardımıyla görüntülenmiştir.

3.2.5. Plazmid ekstraksiyonu

İzolatların kanlı agarda saf olarak üremiş kolonilerinden, 5 ml Luria-Bertani broth (Conda, İspanya) besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Sıvı besiyerleri, 37 °C'lik etüvde 20 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün sıvı besiyerlerinden 1,5 ml alınarak 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. 17310 xg'de 5 dakika santrifüj edilen ependorfların üst kısmındaki supernatant atılarak kalan pellet 500 ml distile su ile süspanse edilmiştir. Ardından hücreler 95 °C'de ısı döngü cihazında 10 dakika lize edilmiş ve 17310 xg'de 5 dakika santrifüjden sonra, üstte kalan süpernatant ayrılmıştır. Süpernatant ve 1/100 oranında dilüe edilmiş süspansiyonu daha sonra uygulanacak olan amplifikasyon protokollerinde kullanılmak üzere 2-8 °C'de saklanmıştır (36, 72).

3.2.6. Multipleks PCR ile plazmid kaynaklı AmpC genlerinin saptanması

Plazmid kaynaklı AmpC enzimlerini saptamak amacıyla çizelge.3.1'de ki öncüller kullanılarak multipleks PCR yapılmıştır (36).

Çizelge.3.1. Multipleks PCR’da kullanılan öncül setleri

	Hedef	Öncül	Polarite	Dizi	Ürün Uzunluğu (bp)
1.GRUP	DHA-1	DHA-F	sense	5'-aactttcacaggtgtgctgggt-3'	405
	DHA-2	DHA R	antisense	5'-ccgtacgcatactggctttgc-3'	
	MIR-1	EBC F	sense	5'-tcggtaaagccgatgttgagg-3'	302
	ACT-1	EBC R	antisense	5'-cttcactgcggctgccagtt-3'	
2.GRUP	LAT-1	CIT F CIT R	sense antisense	5'-tgccagaactgacaggcaaa-3' 5'-tttcctgaacgtggctggc-3'	462
	LAT-2				
	LAT-3				
	LAT-4				
	CMY-2				
	CMY-3				
	CMY-4				
	CMY-5				
	CMY-6				
	CMY-7				
	BIL-1				
	MOX-1	MOX F MOX R	sense antisense	5'-gctgctccaggagcacaggat-3' 5'-cacattgacataggtgtggtgc-3'	520
	MOX-2				
	CMY-1				
	CMY-8				
	CMY-9				
	CMY-10				
	CMY-11				
	ACC	ACC F ACC R	sense antisense	5'-aacagcctcagcagccggtta-3' 5'-ttcgccgcaatcatccctagc-3'	346
	FOX-1	FOX F FOX R	sense antisense	5'-aacatggggtatcaggagatg-3' 5'-caaagcgcgtaaccggattgg-3'	190
	FOX-2				
	FOX-3				
	FOX-4				
	FOX-5				

3.2.6.1. Reaksiyonların karışımları:

Birinci grup primerler için (çizelge.3.1); her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 20 µl olacak şekilde;

• Steril distile su	9,25 µl
• 10X Taq buffer	2 µl
• 25 mM MgCl ₂	1,5 µl (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	2 µl (1 mM/final)
• DHA F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• DHA R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• EBC F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• EBC R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• Taq polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	1 µl

konulmuştur (72).

İkinci grup primerler için (çizelge.3.1); her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 20 µl olacak şekilde;

• Steril distile su	5,25 µl
• 10X Taq buffer	2 µl
• 25 mM MgCl ₂	1,5 µl (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	2 µl (1 mM/final)
• CIT F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• CIT R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• MOX F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• MOX R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• ACC F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• ACC R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• FOX F (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• FOX R (10 pmol/µL)	1 µl (10 pmol-final)
• Taq polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	1 µl

konulmuştur (72).

3.2.6.2. Isı döngü programı: Reaksiyon karışımının hazırlandığı ependorflar ısı döngü cihazına (Perkin Elmer GenAmp 9600, Roche, Almanya) yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 25 döngü gerçekleştirilmiştir (36, 72);

94 °C’de 10 dakika ön denatürasyon
94 °C’de 30 saniye denatürasyon
64 °C’de 30 saniye birleşme
72 °C’de 1 dakika uzama
72 °C’de 7 dakika son uzama

} 25 döngü

3.2.6.3. Agaroz jel elektroforezi

Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla, 1X TBE içerisinde %2 oranında agaroz jel hazırlanarak mikrodalga fırında eritilmiştir. 150 ml eriyik içine etidyum bromid çözeltisinden 15 µl eklenerek jel kasetine dökülmüştür. Taraklar jel kasetine yerleştirildikten sonra donmaya bırakılmıştır. Plazmid DNA’ları jel yükleme bufferı ile 1/6 oranında (2 µl jel yükleme buffer + 10 µl plazmid) karıştırılarak her bir kuyuya 12 µl olacak şekilde pipetlenmiştir. Her jelde örneklerin yanısıra GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus marker büyüklük belirleyici olarak kullanılmıştır. Jel, 1X TBE içinde 120 V’da 30 dakika yürütülmüştür. Sonuçlar ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelenmiş ve görüntülenmiştir. Elde edilen band büyüklükleri marker ile karşılaştırılmış ve çizelge.3.1’de belirtilen ürün uzunlukları ile uyumlu bulunan bandlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Family-spesifik primerlerle PCR

Önceki PCR deneyinde pozitif olduğu belirlenen ürünlerin amplifikasyonu çizelge.3.2’de belirtilen family-spesifik öncüller yardımıyla farklı ısı döngü programlarında tekrarlanmış ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (36, 72).

Çizelge.3.2. PCR’da kullanılan family-spesifik öncül setleri

Öncül	Polarite	Dizi	Ürün Uzunluğu (bp)	Hedef
DHA-1F DHA-1R	sense antisense	5’-tctgccgctgataatgtcg-3’ 5’-gccgccggatcattcagcgc-3’	263	<i>bla</i> _{DHA-1}
DHA-2F DHA-2R	sense antisense	5’-tctgccgctgataatgtcg-3’ 5’-tctgccgggtcattcaacat-3’	263	<i>bla</i> _{DHA-2}
CMY-1F CMY-1R	sense antisense	5’-tgagcaagaccctgactgc-3’ 5’-gcaatgtctgctcggtgac-3’	654	<i>bla</i> _{CMY-1, -8, -10, -11} ve <i>bla</i> _{MOX-1}
CMY-2F CMY-2R	sense antisense	5’-ctatggcgtgaaatccagc-3’ 5’-ttgtttgccagcatcacgatg-3’	366	<i>bla</i> _{CMY-2, -4, -6, -7, -12, -13, -14, -18} ve <i>bla</i> _{LAT-1, -2, -3, -4}

3.2.7.1. Reaksiyonların karışımları:

Her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 20 µl olacak şekilde;

- Steril distile su 11,25 µl
- 10X Taq buffer 2 µl
- 25 mM MgCl₂ 1,5 µl (1,5 mM/final)
- dNTP (2,5 mM/her biri) 2 µl (1 mM/final)
- *Öncül F (10 pmol/µL) 1 µl (10 pmol-final)
- *Öncül R (10 pmol/µL) 1 µl (10 pmol-final)

- Taq polimeraz (5 U/μl) 0,25 μl (1,25 U/final)
- Ekstraksiyon ürünü 1 μl

konulmuştur (72).

* Her bir örnek için bla_{DHA} ve bla_{CMY} bölgelerine özgü dört ayrı öncül seti için de bu karışım kullanılmıştır (çizelge.3.2).

3.2.7.2. Isı döngü programı: CMY-1 ve CMY-2 benzeri enzimler ile DHA-1 ve DHA-2 beta laktamazları saptamak için ısı döngü cihazında iki farklı program kullanılmıştır (72).

CMY-1 benzeri ile CMY-2 benzeri enzimler için ısı döngü programı aşağıdaki gibidir.

94 °C'de 10 dakika ön denatürasyon	
94 °C'de 30 saniye denatürasyon	} 25 döngü
53 °C'de 30 saniye birleşme	
72 °C'de 1 dakika uzama	
72 °C'de 7 dakika son uzama	

DHA-1 ve DHA-2 beta laktamazlar için ısı döngü programı aşağıdaki gibidir.

94 °C'de 10 dakika ön denatürasyon	
94 °C'de 30 saniye denatürasyon	} 25 döngü
58 °C'de 30 saniye birleşme	
72 °C'de 1 dakika uzama	
72 °C'de 7 dakika son uzama	

3.2.8. PCR ile bla_{TEM}, bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} beta laktamaz genlerinin saptanması

Üç boyutlu test ve kombine disk test pozitif saptanan suşlarda CTX-M, TEM ve SHV enzimlerinin varlığını araştırmak için çizelge.3.3'de ki öncüller yardımıyla PCR yapılmış ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Çizelge.3.3. PCR’da kullanılan öncül setleri

Öncül		Polarite	Dizi	Ürün Uzunluğu (bp)
bla _{CTX-M}	CTX-M F CTX-M R	sense antisense	5'-cgctttgcgatgtgcag-3' 5'-acggcgatatcggttgg-3'	920
bla _{TEM}	TEM F TEM R	sense antisense	5'-gagtattcaacatttcggtgc-3' 5'-taatcagtgaggcacctatctc-3'	850
bla _{SHV}	SHV F SHV R	sense antisense	5'-cgccgggtattcttatttgcgc-3' 5'-tctttccgatgccgccgagcagca-3'	1016

3.2.8.1. Reaksiyonların karışımı:

CTX-M PCR; Her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 50 µl olacak şekilde;

- Steril distile su 33 µl
- 10X Taq buffer 5 µl
- 25 mM MgCl₂ 2,5 µl (1,5 mM/final)
- dNTP (2,5 mM/her biri) 2 µl (100 µM/final)
- *Öncül F (25 pmol/µL) 1 µl
- *Öncül R (25 pmol/µL) 1 µl
- Taq polimeraz (5 U/µl) 0,5 µl (1,25 U/final)
- Ekstraksiyon ürünü 5 µl

konulmuştur.

* Her bir örnek için bla_{CTX-M} bölgesine özgü çizelge.3.3'deki öncül seti kullanılmıştır.

TEM PCR; Her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 50 µl olacak şekilde;

• Steril distile su	32,3 µl
• 10X Taq buffer	5 µl
• 25 mM MgCl ₂	3 µl (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	1,5 µl (100 µM/final)
• *Öncül F (50 pmol/µL)	1,5 µl
• *Öncül R (50 pmol/µL)	1,5 µl
• Taq polimeraz (5 U/µl)	0,2 µl (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	5 µl

konulmuştur.

* Her bir örnek için bla_{TEM} bölgesine özgü çizelge.3.3'de ki öncül seti kullanılmıştır.

SHV PCR; Her bir örnek için ependorf tüpüne toplam hacim 50 µl olacak şekilde;

• Steril distile su	33,35 µl
• 10X Taq buffer	5 µl
• 25 mM MgCl ₂	3 µl (1,5 mM/final)
• dNTP (2,5 mM/her biri)	1 µl (100 µM/final)
• *Öncül F (25 pmol/µL)	1,2 µl
• *Öncül R (25 pmol/µL)	1,2 µl
• Taq polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl (1,25 U/final)
• Ekstraksiyon ürünü	5 µl

konulmuştur.

* Her bir örnek için bla_{SHV} bölgesine özgü çizelge.3.3'de ki öncül seti kullanılmıştır.

3.2.8.2. Isı döngü programları:

CTX-M PCR için; ependorflar ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 30 döngü gerçekleştirilmiştir.

95 °C'de 12 dakika ön denatürasyon

94 °C'de 1 dakika denatürasyon

50 °C'de 1 dakika birleşme

70 °C'de 2 dakika uzama

72 °C'de 10 dakika son uzatma

} 30 döngü

TEM PCR için; ependorflar ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki

sıcaklıklarda 35 döngü gerçekleştirilmiştir.

95 °C’de 10 dakika ön denatürasyon
95 °C’de 45 saniye denatürasyon
53 °C’de 45 saniye birleşme
72 °C’de 1 dakika uzama
72 °C’de 7 dakika son uzatma

} 35 döngü

SHV PCR için; ependorflar ısı döngü cihazına yerleştirilerek aşağıdaki sıcaklıklarda 30 döngü gerçekleştirilmiştir.

95 °C’de 10 dakika ön denatürasyon
94 °C’de 50 saniye denatürasyon
60 °C’de 40 saniye birleşme
72 °C’de 1 dakika uzama
72 °C’de 10 dakika son uzama

} 30 döngü

3.2.9. DNA dizi analizi

Daha önceki PCR sonucu pozitif olarak belirlenen izolatların *bla_{CMY-1}*, *bla_{CMY}*, *bla_{MOX}*, *bla_{FOX}*, *bla_{BIL}*, *bla_{LAT}*, *bla_{ACT}*, *bla_{MIR}*, *bla_{AmpC[C]}* ve *bla_{AmpC[E]}* allelleri ile uyum gösteren DNA dizilerini belirlemek için, çizelge.3.3’deki öncüller yardımıyla yapılan PCR sonucu elde edilen ürünler kullanılmıştır.

Dizileme reaksiyonu için, PCR sonucu pozitif olarak belirlenen suşların çizelge.3.3’deki öncüller yardımı ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda elde edilen ürünleri, DNA saflaştırma kiti (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işleminin yapılışı;

1. PCR ürününün 10 katı volumde PN buffer eklenmiş ve karıştırılmıştır.
2. QIAquick columnlara örnek aktarılır ve 10000 xg’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
3. QIAquick columnların altındaki collection tüpler atılmış ve yenileri yerleştirilmiştir.
4. 750 µl PE buffer eklenir ve 1 dakika 10000 xg’de santrifüj edilmiştir.
5. QIAquick columnların altındaki collection tüpler atılır ve yenileri yerleştirilmiştir.
6. 1 dakika 10000 xg’de santrifüj edilmiştir.

7. QIAquick columnlar 1.5 ml'lik ependorflara yerleştirilerek, 100-200 µl EB buffer eklenmiş ve tüp 1-2 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
8. 1 dakika 10000 xg'de santrifüj edilmiştir.

Elde edilen ürünler %1.5 agaroz jelde yürütülerek içerdikleri dsDNA konsantrasyonu, Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Beckman Coulter, ABD) prosedürüne göre belirlenmiştir. Saflaştırılmış PCR ürünleri 2-8 °C'de saklanarak dizileme reaksiyonu için gerekli primer ve premiks solüsyonları hazırlanmıştır. Premiks solüsyonunu hazırlamak için dITP kullanılmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda total volum 1100 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan premiks solüsyonu 100'er mikrolitrelik alikotlara ayrılmıştır.

Premiks solüsyonunun içeriği;

10X Sequencing reaction buffer	200 µl
dNTP miks	100 µl
ddUTP Dye Terminator	200 µl
ddGTP Dye Terminator	100 µl
ddCTP Dye Terminator	200 µl
ddATP Dye Terminator	200 µl
Polimeraz enzimi	100 µl

Dizileme reaksiyonu için ependorflara her bir örnek için toplam hacim 20 µl olacak şekilde;

Steril distile su	2 µl
Kalıp DNA	5 µl
Primerler (1.6 mM) (çizelge.3.3)	2 µl
Premiks solusyonu	11 µl

konulmuş ve ardından aşağıdaki sıcaklıklarda ısı döngü cihazında 30 döngü gerçekleştirilmiştir.

- 96 °C'de 20 saniye denatürasyon
- 50 °C'de 20 saniye birleşme
- 60 °C'de 4 dakika uzama

Sekans öncesi purifikasyon işlemi DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) ile aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler CEQ 8000 (Beckman-

Coulter, High Wycombe, İngiltere) cihazına yüklenilmek üzere buz içerisinde laboratuvara götürülmüştür.

1. DyeEx 2.0 spin columnlar collection tüplerin içerisine yerleştirildikten sonra 3000 rpm’de 3 dakika satrifüj edilmiştir.
2. Isı döngü cihazından alınan örnekler, ependorf tüpler içerisine yerleştirilen columnlara aktarılmıştır.
3. DyeEx 2.0 spin columnlar tekrar 3000 rpm’de 3 dakika satrifüj edilmiştir.

Çizelge.3.4. Dizi analizinde kullanılan öncül setleri (73)

	Öncül	Dizi	Ürün Uzunluğu (bp)	Hedef
1. GRUP	C1	5'-gagcagaccctgttcgagat-3'	846	<i>bla</i> _{CMY-1} , <i>bla</i> _{FOX} ve <i>bla</i> _{MOX} genlerinin sekansı için
	C2	5'-gattggccagcatgacgatg-3'		
	C3	5'-tactccaacccagcatagg-3'	519	
	C4	5'-ccacataggcgcccaaagcc-3'		
2. GRUP	CA1	5'-tgctgctgacagcctcttc-3'	1106	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{AmpC[C]} , <i>bla</i> _{BIL} ve <i>bla</i> _{LAT} genlerinin sekansı için
	CA2	5'-tttcaagaatgcgccaggcc-3'		
	CA3	5'-gcgatccggtcacgaaatac-3'	426	
	CA4	5'-ataacgctggatttcacgcca-3'		
3. GRUP	M1	5'-ctataagtaaaaccttcaccgg-3'	870	<i>bla</i> _{MIR} , <i>bla</i> _{AmpC[E]} ve <i>bla</i> _{ACT} genlerinin sekansı için
	M2	5'-tatgccgcctcaacgcgtg-3'		
	M3	5'-tgcgcttttatcaaaactggca-3'	585	
	M4	5'-gccacgtagctgccaacc-3'		

3.2.7.1. Elde edilen dizilerin değerlendirilmesi

Dizilemenin çift taraflı yapılması nedeniyle her PCR ürünü için elde edilen iki dizi birleştirilip tek dizi haline getirilmiştir. Gen bankasından alınan referans diziler ile “BioEdit 5.0.9 Sequence Alignment Editor” programı kullanılarak

hizalanmış ve aminoasit dizilerine çevrilmiştir. Hem nükleotit hem de aminoasit dizileri internet ortamında “blastn” ve “blastp” (nucleotide-blast, protein-blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) program kullanılarak gen bankalarındaki var olan dizilerde aranarak karşılıkları bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Sefoksitin duyarlılık sonuçları

Sefoksitin disk zon çapı 18 mm'den küçük olan, 14'ü *Klebsiella spp.* (1 *K. oxytoca*, 13 *K. pneumoniae*), 27'si *E. coli* olmak üzere toplam 41 izolat çalışmaya alınmıştır. Disk difüzyon testi ile *Klebsiella spp.* suşlarından 7'si sefoksitine dirençli, 7'si sefoksitine az duyarlı bulunmuştur. 27 *E. coli* suşunun 5'i sefoksitine dirençli, 22'si sefoksitine az duyarlı olduğu saptanmıştır.

4.2. Üç Boyutlu Test ve Kombine Disk Test

Beş tanesi *E. coli*, bir tanesi *K. pneumoniae* ve bir tanesi *K. oxytoca* olmak üzere toplam 7 izolatın üç boyutlu test sonucu pozitif olarak saptanmıştır. Üç boyutlu test pozitif olarak belirlenen suşların tamamı, GSBL tarama testi olan seftazidim/seftazidim-klavulanik asit ve sefotaksim/sefotaksim-klavulanik asit kombine disk test yöntemleri ile GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Üç boyutlu test ve kombine disk test pozitif olan 7 suşdan 2 tanesinde yapılan PCR sonucunda CMY-2 benzeri enzim ürettikleri bulunmuştur (resim.4.3.).

Sefoksitine dirençli bulunan ve aynı zamanda üç boyutlu test sonucu pozitif olarak belirlenen bir *E. coli* suşunun ise, Phoenix sistemi, disk difüzyon ve E test yöntemiyle karbapenemlere dirençli olduğu saptanmıştır. Suşların üç boyutlu test sonuçları ile disk difüzyon yöntemiyle belirlenen sefoksitin duyarlılıklarının karşılaştırılması çizelge.4.1.'de verilmiştir.

Çizelge.4.1. Suşların üç boyutlu test sonuçları ile disk difüzyon yöntemiyle belirlenen sefoksitin duyarlılıklarının karşılaştırılması

	Klebsiella spp.			E.coli		
	Üç boyutlu test pozitif	Üç boyutlu test negatif	Toplam	Üç boyutlu test pozitif	Üç boyutlu test negatif	Toplam
Sefoksitin az duyarlı	-	7	7	2	20	22
Sefoksitin dirençli	2	5	7	3 ^a	2	5
Toplam	2	12	14	5	22	27

^a ile işaretli suşların 2'sinin CMY-2 benzeri enzim salgıladığı belirlenmiştir. Diğer izolat ise karbapenemlere dirençli bulunmuştur.

Üç boyutlu test pozitif saptanan suşların besiyerlerinde sefoksitin diskine doğru yapmış oldukları distorsiyon incelendiğinde, sefoksitine az duyarlı olan izolatların yaptıkları distorsiyonun büyüklüğünün, sefoksitine dirençli saptanan suşların yaptıkları distorsiyonun büyüklüğünden daha az olduğu gözlenmiştir. Üç boyutlu test sonucu pozitif saptanan suşların yapmış oldukları distorsiyon ile disk difüzyon yöntemiyle belirlenen zon çapları arasında ise ilişki bulunamamıştır. Suşların yapmış oldukları distorsiyonun büyüklüğü ile sefoksitin duyarlılıkları arasındaki ilişki çizelge.4.2.'de verilmiştir.

Çizelge.4.2. Distorsiyon büyüklüğü ile disk difüzyon yöntemiyle belirlenen sefoksitin duyarlılıklarının karşılaştırılması

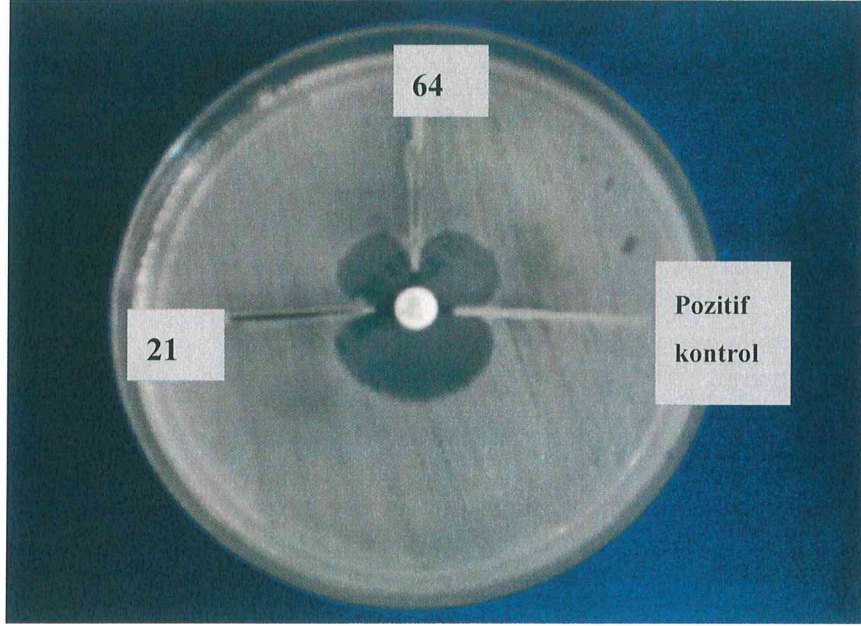
		E.coli		Klebsiella oxytoca	Klebsiella pneumoniae
		Sefoksitine dirençli	Sefoksitine az duyarlı	Sefoksitine dirençli	Sefoksitine dirençli
Distorsiyon çapları	3 mm	-	1	-	-
	4 mm	-	1	-	-
	5 mm	2 ^a	-	-	-
	6 mm	1 ^b	-	1	1

^a ile işaretli suşların CMY-2 benzeri enzim salgıladığı belirlenmiştir.

^b ile işaretli suş karbapenemlere dirençli olarak bulunmuştur.

PCR sonucunda CMY-2 benzeri enzim ürettikleri saptanan suşların resim.4.1.'de sefoksitin diskine doğru yapmış oldukları distorsiyon görülmektedir.

Resim.4.1. CMY-2 benzeri enzim salgıladığı belirlenen *E. coli* suşlarının (suş no 21, suş no 64) üç boyutlu test sonucu oluşturdukları distorsiyonların görüntüleri (*Pozitif kontrol olarak CMY-2 pozitif suş kullanılmıştır.)



Üç boyutlu test pozitif olarak değerlendirilen izolatların disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde, AmpC tipi enzim üreten suşlardan PCR ile aynı zamanda CTX-M türevi GSBL ürettiği belirlenen izolat seftriaksona dirençli, aztreonama az duyarlı, gentamisin ve trimetoprim-sulfametaksazole duyarlı iken, TEM türevi GSBL salgılayan izolat ise seftriaksona az duyarlı, gentamisin ve trimetoprim-sulfametaksazole dirençli, aztreonama ise duyarlı olarak saptanmıştır. Üç boyutlu test sonucu pozitif olarak bulunan tüm suşların disk difüzyon yöntemi ile saptadığımız duyarlılık sonuçları çizelge.4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge.4.3. Üç boyutlu test pozitif olan suşların disk difüzyon yöntemiyle saptanan antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

	TZP	SAM	AMC	FOX	CTX	CRO	CAZ	FEP	LEV	CIP	SXT	SCF	GM	AN	AZT
Suş no 18 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S
Suş no 31 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
Suş no 52 ^d (<i>E. coli</i>)	S	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S
Suş no 21 ^{a, b} (<i>E. coli</i>)	S	R	R	R	R	I	I	S	R	R	R	S	R	S	S
Suş no 64 ^{a, c} (<i>E. coli</i>)	S	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	S	S	I
Suş no 58 (<i>E. coli</i>)	S	I	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Suş no 23 (<i>E. coli</i>)	S	R	I	I	R	R	I	S	R	R	R	S	S	S	R

“^a” ile işaretli suşların CMY-2 benzeri enzim salgıladığı, “^b” ile işaretli suşun aynı zamanda TEM pozitif olduğu, “^c” ile işaretli suşun aynı zamanda CTX-M pozitif olduğu, “^d” ile işaretli suşun ise karbapenemlere dirençli olduğu saptanmıştır.

AM: ampisilin, SAM: ampisilin-sulbaktam, AMC: amoksisilin-klavulanat, TZP: piperasilin-tazobaktam, IP: imipenem, MEM: meropenem, FOX: sefoksitin,

CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, CRO: seftriakson, SCF: sefaperazon-sulbaktam, FEP: sefepim, AZT: aztreonam, LEV: levofloksasin, CIP: siprofloksasin,

GM: gentamisin, AN: amikasin, SXT: trimetoprim-sulfametaksazol

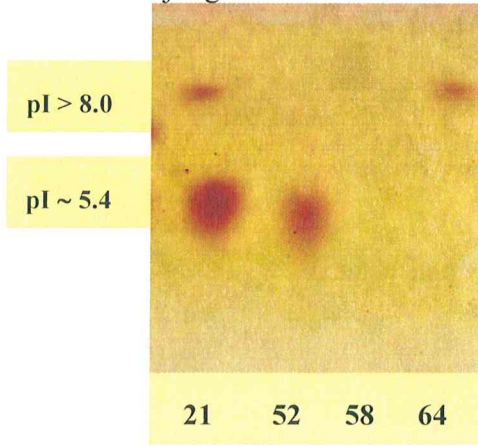
R: dirençli, I: az duyarlı, S: duyarlı

4.3. İzoelektrik Odaklama

Üç boyutlu test ve kombine disk test pozitif olarak saptanan sefoksitine dirençli veya az duyarlı 7 suş izoelektrik odaklama yöntemi ile incelenmiştir.

Bu suşların pI değerleri incelendiğinde, hem AmpC beta laktamazlarla uyumlu, hem de TEM, SHV türevi GSBL'lar ile uyumlu bandların olduğu gözlenmiştir. Resim.4.2.'de PCR ile CMY-2 benzeri enzim salgıladığını belirlediğimiz suşlar ile karbapenemlere dirençli olduğu saptanan *E. coli* izolatu'nun poliakrilamid jelde enzim bandları görülmektedir.

Resim.4.2. Üç boyutlu test pozitif olarak saptanan suşlardan bazılarının poliakrilamid jel görüntüleri

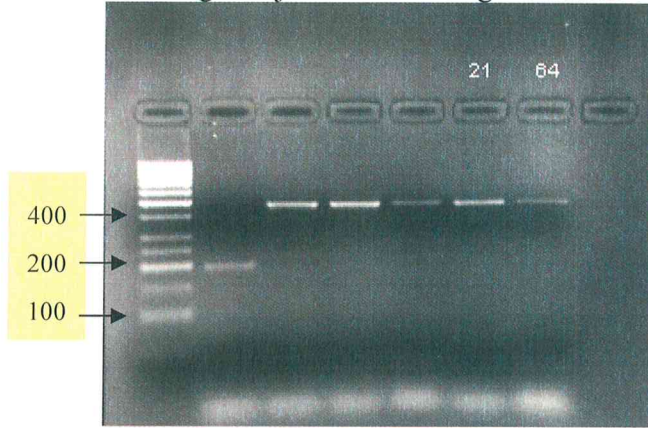


Kombine disk test pozitif saptanan 7 suşun IEF sonuçları çizelge.4.4.'de gösterilmiştir.

4.4. Multipleks PCR

Sefoksitine dirençli veya az duyarlı toplam 41 izolat, AmpC beta laktamaz genlerinin varlığı açısından hem çizelge.3.1.'deki primerler hem de çizelge.3.2.'deki primerler kullanılarak incelenmiş, birinci grup primerlerle yaklaşık 500 bp uzunluğunda banda sahip olan iki izolatın CMY-2 benzeri enzim ürettiği saptanmıştır (resim.4.3.).

Resim.4.3. Birinci grup primerler (çizelge.3.1.’deki) ile multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri



(Soldan sağa jel sırası; ladder, FOX-3 kontrol suşu, CMY-6 kontrol suşu, LAT-1 kontrol suşu, CMY-2 kontrol suşu, suş no 21, suş no 64)

PCR ile pozitif saptanan suşların izoelektrik odaklama yöntemi ile elde edilen enzim bandlarının $pI > 8.0$ değerlerinin AmpC beta laktamazlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

4.5. TEM, SHV ve CTX-M PCR Sonuçları

PCR ile AmpC beta laktamaz ürettiği saptanan suşlar TEM, SHV, CTX-M türevi GSBL’ların varlığı açısından PCR ile incelendiklerinde, suş no 21’in izoelektrik odaklamada elde edilen $pI \sim 5.4$ değeri ile uyumlu olarak TEM pozitif olduğu, izoelektrik odaklamada tek bir band görüntüsü olan suş no 64’ün ise CTX-M pozitif olduğu bulunmuştur.

Kombine disk test yöntemi ile GSBL pozitif saptanan ve izoelektrik odaklama yöntemi ile de poliakrilamid jelde GSBL’lar ile uyumlu bandları olduğu gözlenen diğer izolatların PCR sonuçları çizelge.4.4.’de verilmiştir.

Çizelge.4.4. Üç boyutlu test ve kombine disk test pozitif olan suşların tüm test sonuçları

	Suş no 18 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Suş no 21 (<i>E. coli</i>)	Suş no 23 (<i>E. coli</i>)	Suş no 31 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	Suş no 52 (<i>E. coli</i>)	Suş no 58 (<i>E. coli</i>)	Suş no 64 (<i>E. coli</i>)
Sefoksitin duyarlılığı	R	R	I	R	R	I	R
Karbapenemlere duyarlılık	S	S	S	S	R	S	S
Üç boyutlu test distorsiyon çapı	6 mm	5 mm	3 mm	6 mm	6 mm	4 mm	5 mm
Seftazidim/seftazidim-klavulanat Kombine disk test	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Sefotaksim/sefotaksim-klavulanat Kombine disk test	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
IEF ile belirlenen pI değeri	~7.6	~5.4, >8.0	~5.4	Band yok	≤5.4	Band yok	>8.0
AmpC PCR sonucu	negatif	CMY-2 benzeri	negatif	negatif	negatif	negatif	CMY-2 benzeri
bla _{TEM} , bla _{SHV} , bla _{CTX-M} PCR sonuçları	SHV (+)	TEM (+)	TEM (+)	negatif	TEM (+)	negatif	CTX-M (+)

R: dirençli, I: az duyarlı, S: duyarlı

4.6. Dizi Analizi

Çizelge.3.1. ve çizelge.3.2.'deki öncüller kullanılarak yapılan PCR sonucunda CMY-2 benzeri enzim ürettikleri belirlenen suşların, çizelge.3.4.'deki CA1 ve CA2 öncülleri yardımıyla gerçekleştirilen dizileme reaksiyonları sonucunda, izolatların CMY-2 benzeri beta laktamaz ürettikleri doğrulanmış, ancak bu örneklerin enzim tipleri tam olarak belirlenememiştir.

5. TARTIŞMA

E. coli ve *Klebsiella* türlerinde 3. kuşak sefalosporinlere direncin sadece hastaneden değil, toplum kökenli infeksiyonlardan izole edilen suşlar arasında da yayılması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Sefalosporin direncinin en sık nedeni GSBL'lar iken, AmpC beta laktamazlar da bu direncin gelişimine aracı olabilmektedirler. Plazmidle kodlanan AmpC beta laktamaz üreten klinik izolatlarda, bu enzimlerin saptanması güçtür.

Çok geniş direnç profiline sahip AmpC enzimlerinin varlığı, hastaların tedavi seçeneklerinin sadece karbapenemler, sefepim, sefpirom ve temosillin ile sınırlı olmasına neden olmaktadır (74). Bu nedenle AmpC üreten organizmaların saptanması, etkili bir tedavi ve iyi bir klinik sonuç elde etmek açısından önemlidir.

Yapılan çalışmalarda 1995-1997 yılları arasında ABD'deki *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* türlerinin sırasıyla, %1.7, %7.6, %1.9'unda plazmid aracılı AmpC enzimlerine rastlanırken, daha sonraki çalışmalarda direnç yayılımının arttığı, oksimino beta laktam dirençli izolatlar arasında *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. coli* türlerinin sırasıyla %6.9, %8.5, %4'ünün plazmid aracılı AmpC enzimi ürettikleri bulunmuştur (68, 75). Bu sonuçlardan da açıkça görüldüğü üzere GSBL'larda olduğu gibi, *ampC* beta laktamazların da en azından fenotipik metodlar ile, bu enzimi üreten klinik izolatlardan rutin olarak saptanması gerekmektedir. Bu anlamda ihtiyaç olan, bu enzimleri basit fakat doğru olarak saptayabilen bir yöntemdir. Plazmid aracılı AmpC enzimi üreten izolatlarda fenotipik tanı yöntemlerinin sensitivitesi AmpC enzim tipine bağlı olarak değişebilmektedir. AmpC üretiminin fenotipik olarak saptanması için üç boyutlu testin çeşitli modifikasyonları tanımlanmıştır (69, 76). Modifiye yöntem, AmpC enzimlerinin saptanmasında olduğu gibi IMP-1 ve VIM-2 metallo beta laktamaz üreten Gram negatif basillerin saptanmasında da oldukça hassastır (77). Üç boyutlu test ise, modifiye yöntemine göre uygulaması zor, özgüllüğü daha yüksek olan bir testtir (72).

Aktarılabilen AmpC pozitif izolatların saptanması yalnızca geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli olmaları nedeniyle klinik önem taşımamaktadırlar, suшта aynı zamanda porin ekspresyonu azalması da

bulduğunda karbapenem direncine de yol açabilmektedirler (75).

Halen birden fazla beta laktamaz üreten ya da plazmid aracılı AmpC üreten mikroorganizmaların saptanmasında kabul görmüş referans yöntem bulunmamaktadır. Beta laktam inhibitörleri ile sefamisinler ya da oksimino beta laktamların aktivitelerinin inhibisyonu AmpC enzimlerinin varlığının dolaylı bir göstergesidir.

Çalışmamızda plazmid kökenli AmpC tipi beta laktamazlar fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelenmiş, özgül AmpC tiplerini belirlemek için DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır.

Disk difüzyon testi ile sefoksitine dirençli ya da az duyarlı bulunan toplam 41 suş fenotipik bir yöntem olan üç boyutlu test ile incelendiğinde 7 izolat pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu suşlardan ikisini AmpC enzimi ile aynı zamanda GSBL üreten *E. coli* suşu, bir tanesini SHV türevi GSBL üreten *Klebsiella spp.* izolatı, bir tanesini TEM türevi GSBL üreten *E. coli* izolatı, bir tanesini ise karbapenemlere dirençli olduğu saptanan *E. coli* suşu oluşturmaktadır. Diğer 2 izolatın ise izoelektrik odaklama yöntemi ile poliakrilamid jelde band görüntüsü elde edilememiş, AmpC, TEM, SHV ve CTX-M primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları da negatif bulunmuştur. Ancak bu 2 izolatın kombine disk test yöntemiyle pozitif olarak saptanması, izolatların TEM, SHV ve CTX-M dışında zayıf üretilen başka bir GSBL enzimi taşıyabileceklerini düşündürmektedir. Aynı izolatlarda izoelektrik odaklama yöntemi ile de band elde edilememiştir. Bunun nedeninin ise enzimin zayıf ekspresyonuna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sefamisin direnci *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında, *ampC* genlerinin plazmidlerle aktarılmasına, dış membran protein değişikliklerine, IMP-1 gibi metallo beta laktamazlara bağlı gelişebilmektedir (36, 53, 64, 70, 78, 79). Sefoksitin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının çoğunda (%86), sefamisin direnci AmpC enzimleri nedeni ile karşımıza çıkmamaktadır (68). Bir çalışmada sefoksitine dirençli, AmpC PCR'ı negatif bulunan 11 suşda *ampC* promoter bölgesinde mutasyon olduğu gösterilmiştir (80). *AmpC* geninin, attenuator ve/veya promoter bölgelerindeki mutasyonlarının enzimin aşırı üretimine yol açtığı, beta laktam ve beta laktamaz inhibitörlerine dirençli *E. coli* izolatlarında iyi bilinen bir mekanizmadır. Sefoksitin direnci AmpC enzimlerinin saptanmasında

duyarlılığı yüksek ancak özgüllüğü düşük bir göstergedir. Sefoksitin dirençli AmpC üreten suşlarda karbapenemler tedavi seçeneğimiz iken, sefoksitin dirençli AmpC üretmeyen ve GSBL enzimi de bulunmayan suşlarda geniş spektrumlu sefalosporinler de tedavide kullanılabilirler. Bu nedenle sefoksitin dirençli AmpC üreten suşlar ile sefoksitin dirençli AmpC üretmeyen suşların ayırımının yapılması oldukça önemlidir (81). Çalışmamızda 5 tanesi *E. coli*, 7 tanesi *de Klebsiella spp.* olmak üzere toplam 12 izolat sefoksitine dirençli bulunmuştur. Ancak bunlardan yalnızca 2 *E. coli* izolatında AmpC beta laktamaz varlığı gösterilmiştir.

Coudron ve ark (68) sefoksitin zon çapı 18 mm'den küçük 45 suşda plazmid kökenli AmpC varlığını araştırmışlar, IEF ile izoelektrik noktalarını AmpC beta laktamazlarla uyumlu saptamış oldukları 16 suşun aynı zamanda üç boyutlu test ile de pozitif olduğunu bulmuşlardır. AmpC beta laktamaz taşımayan suşlardan SHV tip GSBL taşıyan bir suşu da üç boyutlu test pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda, üç boyutlu test ile pozitif saptanan 7 suşdan 2'sinin AmpC beta laktamazlarla beraber GSBL ürettikleri, aralarında karbapenemlere dirençli izolatında bulunduğu 3'ünün ise yalnızca GSBL ürettikleri belirlenmiştir. Araştırmamızda AmpC beta laktamaz salgıladığını belirlediğimiz izolatlardan aynı zamanda CTX-M tipi GSBL enzimi de taşıyan bir suşumuzda izoelektrik odaklama yöntemi ile yalnızca AmpC beta laktamazlarla uyumlu tek bir band varlığına rastlanmıştır. Bunun CTX-M tipi enzimin zayıf salgılanmasına ya da bu iki enzimin pI değerlerinin aynı olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Fakat poliakrilamid jele çok az miktarda sonikasyon ürününün yüklenmiş olmasının da bu duruma neden olabileceği bildirilmektedir.

Plazmidik beta laktamaz üreten mikroorganizmalar aminoglikozidlere ve florokinolonlara özellikle levofloksasine sıklıkla dirençlidirler (82). CMY-2, TEM-1 beta laktamaz ile birlikte konjugasyon ile transfer edilebilmektedir. Bu durumda kloramfenikol, gentamisin, tobramisin, tetrasiklin ve streptomisini de içeren çoklu ilaç direnci ortaya çıkmaktadır (83). Çalışmamızda da CMY-2 benzeri AmpC beta laktamaz pozitif saptanan suşlardan aynı zamanda TEM türeği GSBL'da ürettiğini belirlediğimiz suşun gentamisine ve tobramisine dirençli olduğu, CTX-M tipi GSBL üretenin ise bu antimikrobiyallere duyarlı olduğu

bulunmuştur.

AmpC üreten mikroorganizmaların seftazidim ve seftriakson duyarlılık sonuçları da oldukça önemlidir. Bir çalışmada bu izolatların otomatize sistemlerle %71 ve %40'ı sırasıyla seftriakson ve seftazidime duyarlı olarak bulunmuştur (70). Çalışmamızda ise, CMY-2 benzeri enzim ürettikleri saptanan suşlar seftazidime az duyarlı, seftriaksona biri az duyarlı, diğeri dirençli bulunmuştur. Song ve ark (84) da 2002-2004 yılları arasında Kore'de yaptıkları bir çalışmada *K. pneumoniae* suşlarının %2.9'unda, *K. oxytoca* izolatlarının %2.5'inde, *Salmonella spp.* izolatlarının ise %0.8'inde plazmid aracılı AmpC beta laktamaz varlığını saptamışlardır. Çalışmaya aldıkları toplam 46 suşun duyarlılıklarını incelediklerinde %0'ının piperasiline ve sefoksitine, %54.3'ünün piperasilin-tazobaktama, %52.2'sinin sefotaksime, %23.9'unun seftazidime, %63'ünün aztreonama, %97.8'inin sefepime, %100'ünün imipeneme duyarlı olduklarını bulmuşlardır.

Yapılan bazı çalışmalarda sefepimin ve karbapenemlerin AmpC beta laktamaz üreten organizmaların neden olduğu infeksiyonlarda kullanılabileceği belirtilirken, bir çalışmada ACT-1 ve CMY-2 enzimleriyle beraber membran permeabilite kaybı olan suşlarda, imipenem direncinin anlamlı olarak arttığı, bir başka çalışmada ise dış membran proteinlerinin kaybının olduğu AmpC üreten mikroorganizmalarda sefepim ya da sefpiromun inokulum etkisinin olduğu bildirilmiştir (14, 85, 86, 87). Çalışmamızda sınıf C beta laktamaz ürettikleri belirlenen izolatların duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelendiğinde; piperasilin-tazobaktama, amikazine, sefepime, sefaperazon-sulbaktama ve karbapenemlere duyarlı, sefotaksime ise dirençli oldukları görülmüştür. Bu iki suşdan CTX-M tipi GSBL üreten aztreonama az duyarlı iken, diğeri duyarlı bulunmuştur.

CMY-2 (BIL-1, LAT-2) ilk kez 1990 yılında Yunanistan'da *K. pneumoniae* suşundan izole edilmiştir (88). Başlangıçta Avrupa'da saptanmasına rağmen, son zamanlarda bazı Uzak Doğu ülkelerinde hastane kaynaklı türlerden de sıkça izole edilmektedir.

CMY-2, yüksek prevalans ve geniş coğrafik dağılım gösteren plazmidik bir beta laktamaz enzimidir. 1992-2000 yılları arasında ABD'de yapılan bir

çalışmada, plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının sıklığını sırasıyla %8.5 ve %4 olarak saptanmıştır (75). Moland ve ark (89) ise *K. pneumoniae* izolatlarında bu oranı %3.3 olarak bulmuşlardır. Navarro ve ark (90) İspanya’da yaptıkları çalışmada, AmpC direnç fenotipine sahip 153 suşun 21’inde PCR ile AmpC beta laktamaz varlığını göstermişlerdir. Kim ve ark (91) Kore’de yaptıkları araştırmalarında, daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarının sırasıyla %5.1 ve %2.9’unun plazmid kaynaklı AmpC beta laktamaz ürettiklerini belirlemişlerdir. Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada İstanbullu ve ark (92) da, 29 *E. coli* suşundan 3 (%10.34)’ünde, 71 *K. pneumoniae* suşundan 7 (%9.85)’sinde plazmid kökenli AmpC varlığını saptamışlardır. Çalışmamızda bir senelik zaman diliminde toplanan ve disk difüzyon yöntemiyle sefoksitin dirençli ya da az duyarlı bulunan 27 *E. coli* izolatından 2 (%7.4)’sinde CMY-2 benzeri enzim varlığı saptanmıştır. Bu dönem içinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella* türlerinde plazmid kaynaklı AmpC sıklığı ise sırasıyla %0.1 ve %0 olarak bulunmuştur. Bu oran dikkate alındığında AmpC sıklığımızın diğer araştırmacıların saptadığı oranlara göre düşük olmasının, yapılan çalışmalarda dirençli suşlarda AmpC prevalansının belirtilmiş olmasına, suşların seçiminde bir konsensus olmamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Diğer beta laktamazlarda olduğu gibi plazmidik AmpC enzimlerinin prevalansı da bölgeden bölgeye değişebilmektedir.

Yan ve ark (83) 2003 yılında Tayvan’da yaptıkları çalışmada, *E. coli* suşlarında CTX-M tipi GSBL’lar ile CMY-2 benzeri AmpC enzimlerinin, *K. pneumoniae* izolatlarında ise SHV ve CTX-M tipi GSBL’lar ile DHA-1 AmpC enzimlerinin görülme oranının yüksek olduğunu belirlemişlerdir. İlginç olarak bu çalışmada 5’i CMY-2 benzeri enzim ile beraber aynı zamanda SHV-5 ile ilişkili enzimde üreten *E. coli* izolatı, diğer 5’i de DHA-1 ve aynı zamanda SHV-5 ile ilişkili enzim üreten *K. pneumoniae* izolatı olmak üzere toplam 10 GSBL üreten izolat, CLSI’nın önerdiği doğrulama testleri ile GSBL negatif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda CMY-2 benzeri enzim ürettiğini saptanan suşlarda aynı zamanda CTX-M ve TEM türevi GSBL’ların varlığı PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Pai ve ark (23) önceden antimikrobiyal tedavi alan özellikle sefalosporin

kullanan ve kan kültüründen AmpC beta laktamaz üreten *K. pneumoniae* izole edilen hastalarda, yüksek oranda tedavi başarısızlıkları olduğunu göstermişlerdir. AmpC beta laktamazlar sefalosporinleri substrat olarak kullanırlar. Bu nedenle in vitro duyarlılıkları farklı olmasına rağmen AmpC üreten izolatlar tüm sefalosporinler için dirençli olarak yorumlanmalıdırlar (70). GSBL üreten ve çoklu direnç profiline sahip AmpC üreten suşların artışı, karbapenemlerin yoğun kullanımına, sonuçta gelecekte karbapenemlere de dirençli ciddi infeksiyonların ortaya çıkmasına yol açabilecektir (74). Bu nedenle AmpC pozitif olabilecek suşlarında en azından çeşitli tarama yöntemleri ile belirlenip bildirilmesi, ileride dirençli suşların yayılımı ile ortaya çıkabilecek tedavi sorunlarının engellenmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde PCR ile AmpC beta laktamaz ürettikleri belirlenen suşların sefoksitine dirençli oldukları, üç boyutlu test sonucunda yapmış oldukları distorsiyonun kuvvetli olduğu, izoelektrik odaklama ile saptanan enzim bandlarının sınıf C beta laktamazlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Sefoksitine dirençli saptanan suşlarda üç boyutlu test ve IEF'nin AmpC beta laktamaz enzimlerini saptamada oldukça değerli olduğunu, bu yöntemlerin laboratuvarımızda tarama testi olarak kullanılabileceğini ve tarama testi pozitif olan suşlarda PCR ile enzimlerin belirlenmesinin, hem epidemiyolojik açıdan hem de tedaviye yön vermesi bakımından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Tüm dünyada farklı bakterilerde saptanabilen plazmid kaynaklı beta laktamazlar genellikle *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de bulunurlar. *AmpC* genleri genellikle diğer direnç genleriyle birlikte aynı plazmid üzerinde taşınırlar, bu nedenle bu suşlar çoklu direnç özelliği gösterirler. Plazmid kaynaklı *AmpC* enzimi olan pek çok mikroorganizmanın aynı zamanda TEM-1, TEM-2, hatta SHV-5 gibi GSBL enzimlerini de üretebildiği gösterilmiştir. Bu dirençli bakteriler nozokomiyal salgınlara neden olabildikleri gibi, seyahat eden insanlarla ve vektörler aracılığıyla da farklı bölgelere yayılabilirler. *AmpC* üreten organizmaların saptanması, etkili bir tedavinin sağlanması ve sonrasında direnç gelişiminin, yayılımının önlenmesi açısından önemlidir.

Klinik izolatlarda *AmpC* beta laktamaz varlığını belirlemek için çok sayıda fenotipik yöntem önerilmiştir. Sefoksitin direnci ve beta laktam, beta laktamaz inhibitörlerine direnç plazmid kaynaklı *AmpC* varlığına işaret eden duyarlılığı yüksek ancak özgüllüğü düşük bir göstergedir. Üç boyutlu test de *AmpC* beta laktamazların saptanmasında kullanılan fakat tam olarak standardize edilememiş fenotipik testlerdendir. Günümüzde, dörtyüzden fazla beta laktamazın bilinmesi ve bunların birçoğunun da izoelektrik noktalarının benzer olması, beta laktamazların tiplendirilmesinde IEF yönteminin de yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Fenotipik yöntemlerde ortaya çıkan sorunlar nedeniyle moleküler yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır. PCR en sık kullanılan yöntemdir, ancak sadece enzim sınıfını belirleyebilmektedir. Nükleotid dizi analizi ise beta laktamaz tiplerini belirlemede tüm dünyada kabul görmüş altın standart yöntemdir.

Çalışmamızda sefoksitin disk zon çapı 18 mm'den küçük olan, 14'ü *Klebsiella spp.*, 27'si *E. coli* olmak üzere toplam 41 izolat çalışmaya alınmıştır. Bunlardan 2'si *Klebsiella spp.*, 5'i *E. coli* olmak üzere toplam 7 suş, M3D yöntemi ve kombine disk test ile pozitif saptanmış ve GSBL pozitif olarak değerlendirilmişlerdir. Suşlar izoelektrik odaklama yöntemi ile incelendiğinde, pI değerleri GSBL'lar, *AmpC* beta laktamazlarla uyumlu bandların olduğu gözlenmiştir. *AmpC* beta laktamazlar ve TEM, SHV, CTX-M türevi GSBL'lar için yapılan PCR sonucunda da, suşlardan birisinin CTX-M ve CMY-2 benzeri

enzim ürettiği, birisinin TEM ve CMY-2 benzeri enzim ürettiği, birisinin SHV türevi GSBL pozitif olduğu, içlerinden birisi karbapenemlere dirençli olmak üzere toplam iki suşun ise TEM türevi GSBL taşıdığı belirlenmiştir. AmpC beta laktamaz varlığı saptanan iki suş dizileme reaksiyonu için hazırlanmış, ancak dizi analizi sonucunda enzimler tiplendirilememiştir.

Çoklu direnç profiline sahip AmpC üreten suşların izolasyonu, pek çok dirençli infeksiyonun tedavisinde tek seçenek olarak karşımıza çıkabilen karbapenemlerin kullanımının artması ile gelecekte daha ciddi, hatta tedavisi mümkün olmayan infeksiyonların ortaya çıkmasına neden olabilir. AmpC pozitif olabilecek suşların çeşitli tarama yöntemleri ile belirlenip bildirilmesi, ileride dirençli suşların yayılımı ile ortaya çıkabilecek tedavi sorunlarının engellenmesi açısından önemlidir.

7. ÖZET

Sefoksitin Dirençli ya da Az Duyarlı Saptanan *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis* Suşlarındaki Plazmid Aracılı AmpC Beta Laktamaz Enzim Tiplerinin PCR Yöntemi ve Dizi Analizi ile Araştırılması

Plazmid aracılı AmpC beta laktamazlar *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde dünyanın farklı bölgelerinden artan sıklıkla rapor edilmektedirler. Bu mikroorganizmalarla infekte ve aynı zamanda geniş spektrumlu sefalosporinlerle tedavi edilen hastalarda olumsuz klinik sonuçlar da ortaya çıkabilmektedir.

Çalışmamızda, *Klebsiella spp.*, *E. coli* izolatlarında plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazların varlığını araştırmak amaçlanmıştır. Ocak 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gelen tüm klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon ile sefoksitin dirençli ya da az duyarlı saptanan 14 tanesi *Klebsiella spp.* ve 27 tanesi *E. coli* olmak üzere toplam 41 suş çalışmaya alınmıştır. Sefoksitin duyarlılıkları daha önceden belirlenmiş olan suşların IEF yöntemi ile pI değerleri saptanmış ve izolatlar multipleks PCR, dizi analizi yöntemleriyle incelenmiştir.

E. coli izolatlarından yalnızca 2 tanesinde PCR ile CMY-2 benzeri AmpC beta laktamaz varlığı saptanmış, bu suşların aynı zamanda CTX-M tipi ve TEM tipi GSBL da ürettikleri belirlenmiştir.

Aktarılabilen AmpC beta laktamazlar çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmişlerdir. Bu nedenle Gram negatif bakterilerde sınıf C beta laktamazların saptanması, tedavide uygun antimikrobiyal seçiminde klinisyenleri yönlendirmesi açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella spp.*, *E. coli*, plazmid kaynaklı AmpC beta laktamazlar

9. ABSTRACT

Detection of Plasmid-Borne AmpC Beta Lactamase Enzyme Types in Cefoxitin Resistant or Intermediate *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* Isolates by using Multiplex PCR and Sequencing

Plasmid mediated AmpC beta lactamases are reported from *Enterobacteriaceae* with increasing frequency. Unfavorable clinical outcomes in patients infected with these organisms and treated with broad-spectrum cephalosporins have been reported. The aim of our study is to investigate plasmid mediated AmpC beta lactamases in *E. coli* and *Klebsiella spp.*.

41 strains of cefoxitin resistant or intermediate *E. coli* (27 isolates) and *Klebsiella spp.* (14 isolates) were collected from January 2005 to January 2006 at Akdeniz University Hospital Central Laboratory. Three-dimensional test was used as a phenotypic confirmatory test. Analytical isoelectric focusing electroforesis was used to measure the pI value of the beta lactamases. Plasmid mediated AmpC enzymes were amplified by using multiplex polymerase chain reaction and sequenced by Beckman Coulter CEQ 8000.

AmpC beta lactamases were only detected in two isolates of *E. coli*. These isolates produced CMY-2 like enzymes and have either CTX-M and TEM type enzyme.

Transferable AmpC beta lactamases are associated with multiple antibiotic resistance. Therefore detection of the enzymes in gram negative bacteria has a clinical importance, since it can often provide valuable information to clinicians leading to more effective and appropriate use of antimicrobials.

Key words: *Klebsiella spp.*, *E. coli*, plasmid-borne AmpC beta lactamases

9. KAYNAKLAR

1. Gülay Z. Beta-Laktamlara Direnç Mekanizmaları. In: Sercan Ulusoy (eds) Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2005:9-34.
2. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Patrick R. Murray, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC (eds) Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press. 2003:1074-1101.
3. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Plasmid-borne AmpC β -lactamases. Can J Microbiol 2002; 48:479-493.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, Wayne, USA.
5. Gür D. Beta-laktamazlar. Flora Derg 1997; 2(Ek 3):3-18.
6. Gür D. Beta-Laktamazlar. In: Sercan Ulusoy (eds) Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2005:35-44.
7. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8:557-584.
8. Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, Datta N, Grinter NJ, Jacob AE, Kontomichalou P, Dale JW, Smith JT. Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1976; 125:149-157.
9. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1-11.
10. Levesque R, Roy PH, Letarte R, Pechere JC. A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. J Infect Dis 1982; 145(5):753-61.
11. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11:315-317.
12. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum β -

- lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17:316-321.
13. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2200-2209.
 14. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan ST, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:563-569.
 15. Gazouli M, Kaufmann ME, Tzelepi E, Dimopoulou H, Paniara O, Tzouvelekis LS. Study of an outbreak of cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Clin Microbiol* 1997; 35:508- 510.
 16. Nadjar D, Rouveau M, Verdet C, Donnay JL, Herrmann JL, Lagrange PH, Philippon A, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type betalactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 187:35-40.
 17. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates* 2006; 9:142-156.
 18. Gülay Z. İndüklenebilir Beta-Laktamazlar. In: Sercan Ulusoy, Hakan Leblebicioğlu, Dilek Arman (eds) Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2004:95-109.
 19. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
 20. Bush K. Characterization of beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:259-263.
 21. Özsoy MF, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora Derg* 2001;6(Ek 1):3-23.
 22. Gülay Z, Gür D. İndüklenebilir Beta-Laktamazlar; özellikleri, epidemiyolojisi ve klinik önemi. In: Sercan Ulusoy (eds) Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi.

- Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2005:45-69.
23. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, Kim EC, Oh M, Choe KW. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3720-3728.
24. Kang CI, Pai H, Kim SH, Kim HB, Kim EC, Oh M, Choe KW. Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated Amp C-type β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2004; 54:1130-1133.
25. Sanders CC. Beta-lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992; 14:1089-1099.
26. Öngen B. Hastanede sorunlu mikroorganizmalar: Gram Negatif Bakteriler. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, 2-4 Ekim, 2003, Samsun. <http://www.das.org.tr/tr/dosya/kongre/kong2003/index.htm>
27. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, and Blazquez J. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:3137-3143.
28. Maurelli AT, Fernandez RE, Bloch CA, Rode CK and Fasano A. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:3943-3948.
29. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. In: Hakan Leblebicioğlu, Gaye Usluer, Sercan Ulusoy (eds). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2003:31-41.
30. Jones RN. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: The AmpC enzymes. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 31:461-466.
31. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlar ve karbapenemlere direnç. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5:210-229.
32. Opal SM, Mayer KH, Medeiros AA. Mechanisms of bacterial antibiotic

- resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition, Pennsylvania: Churchill Livingstone Inc, 2000:243-288.
33. Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992; 15:824-39.
 34. Wachino JI, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Horizontal transfer of bla_{CMY}-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:534-541.
 35. Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. Emerg Infect Dis 2001; 7:333-336.
 36. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40:2153-2162.
 37. Jacoby GA. β -lactamases nomenclature. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1123-1129.
 38. Bret L, Chanal-Claris C, Sirot D, Chaibi EB, Labia R, Sirot J. Chromosomally encoded AmpC-type beta-lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1110-1114.
 39. Dunne EF, Fey PD, Kludt P, Reporter R, Mostashari F, Shillam P, Wicklund J, Miller C, Holland B, Stamey K, Barrett TJ, Rasheed JK, Tenover FC, Ribot EM, Angulo FJ. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. J Am Med Assoc 2000; 284:3151-3156.
 40. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N Engl J Med 2000; 342:1242-1249.
 41. Winokur RL, Brueggemann A, DeSalvo DL, Hoffmann L, Apley MD, Uhlenhopp EK, Pfaller MA, Doern GV. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated

- CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2777-2783.
42. Jacoby GA, Tran J. Sequence of the MIR-1 betalactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1759-1760.
 43. Barnaud G, Labia R, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Philippon A, Arlet G. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 195:185-190.
 44. Mammeri H, Nazic H, Naas T, Poirel L, Léotard S, Nordmann P. AmpC β -lactamase in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 48(10):4050-4053.
 45. Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β -lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1206-1210.
 46. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM, Tammelin A, Courvalin P, Lambert T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:895-900.
 47. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:573-581.
 48. Girlich D, Karim A, Spicq C, Nordmann P. Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:893-895.
 49. Archambaud M, Gerbaud G, Labau E, Marty N, Courvalin P. Possible in-vivo transfer of β -Lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonella kedougou*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27:427-436.
 50. Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical

- isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1996; 34:908-911.
51. Kim J, Kwon Y, Pai H, Kim J-W, Cho D-T. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J Clin Microbiol 1998; 36(5):1446-1449.
 52. Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon Y, Kim JW and Choe KW. Survey of extended-spectrum β -Lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 1999; 37:1758-1763.
 53. Gazouli M, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC, Tzelepi E. Transferable class C β -lactamase in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase. J Antimicrob Chemother 1998; 42:419-425.
 54. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella spp.* from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother 1996; 38:409-424.
 55. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. J Clin Microbiol 2001; 39(8):2864-2872.
 56. Yan JI, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su LJ. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother 2000; 44(6):1438-1442.
 57. Horton JM, Sing RF, Jenkins SG. Multidrug-resistant *Salmonella* associated with AmpC hyperproduction. Clin Infect Dis 1999; 29:1348.
 58. Payne DJ, Woodford N, Amyes SGB. Characterization of the plasmid-mediated

- β -Lactamase BIL-1. J Antimicrob Chemother 1992; 30:119-127.
59. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi D, Denton M, Todd NJ, Hawkey PM. Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Leeds hospital. J Antimicrob Chemother 1997; 40:823-831.
 60. Koeck J-L, Arlet G, Philippon A, Basmaciogullari S, Thien HN, Buisson Y, Cavallo J-D. A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. FEMS Microbiol Lett 1997; 152:255-260.
 61. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(8):1924-1931.
 62. Bauernfeind A, Wagner S, Jungwirth R, Schneider I, Meyer D. A novel class C β -lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2041-2046.
 63. Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:2716-2722.
 64. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC β -lactamases: How far have we gone 10 years after the discovery?. Yonsei Med J 1998; 39(6):520-525.
 65. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N. Plasmid-mediated AmpC type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(5):984-990.
 66. Leiza MG, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, Baquero F. Gen sequence and biochemical characterization of FOX-1 from

- Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase with two molecular variants. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(9):2150-2157.
67. Gazouli M, Tzouvelekis LS, Prinarakis E, Miriagou V, Tzelepi E. Transferable cefoxitin resistance in *Enterobacteria* from Greek Hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 β -lactamase (LAT-2). Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(7):1736-1740.
 68. 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):1791-1796.
 69. Nasim K, Elsayed S, Pitout JDD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol 2004; 42(10):4799-4802.
 70. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43(8):4163-4167.
 71. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. J Clin Microbiol 2005; 43(7):3110-3113.
 72. Lee K, Hong SG, Park YJ, Lee HS, Song W, Jeong J, Yong D, Chong Y. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC β -lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53:319-323.
 73. Lee SH, Jeong SH, Lee KJ. Evolution of TEM β -lactamase genes identified by PCR with newly designed primers in Korean clinical isolates. Clin Microbiol Infect 2001; 7(2):98-100.
 74. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RLR, Hopkins KL, Kaufmann ME, Kistler J, Palepou MFI, Pike R, Ward ME, Cheesbrough J, Livermore DM. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in the UK and Ireland. J Antimicrob

- Chemother 2007; 59(1):102-105.
75. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2):533-537.
 76. Shahid M, Malik A, Agrawal M, Singhal S. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC β -Lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. J Antimicrob Chemother 2004; 54:684-687.
 77. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation for the Hodge test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo- β -Lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*. J Clin Microbiol 2005; 41:4623-4629.
 78. Doi Y, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Kurokawa H, Yokoyama K, Yagi T, Arakawa Y. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(8):2427-2434.
 79. Muratoni T, Kobayashi T, Matsumoto T. Emergence and prevalence of β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan. Int J Antimicrob Agents 2006; 27:491-499.
 80. Hopkins KL, Batchelor MJ, Liebana E, Deheer-Graham AP, Threlfall EJ. Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995-2003 in England and Wales. Int J Antimicrob Agents 2006; 28:180-192.
 81. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. J Clin Microbiol 2003; 41(2):772-777.
 82. Yum JH, Kim S, Lee H, Yong D, Lee K, Cho SN, Chong Y. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs and CMY-2- and DHA-1-type AmpC β -lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Korean Med Sci 2005; 20:961-965.

83. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Shyr JM, Wan JH, Liu YC, Chuang YC, Yang YC, Tsao SM, Wu HH, Wang LS, Lin TP, Wu HM, Chen HM, Wu JJ. Extended-spectrum β -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):1861-1864.
84. Song W, Kim JS, Kim HS, Yong D, Jeong SH, Park MJ, Lee KM. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55(3):219-224.
85. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3121-3126.
86. Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, Livermore DM, Chong Y. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β -lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:201-206.
87. Martínez- Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, Benedí VJ, Jacoby G. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1669-1673.
88. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(1):221-224.
89. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer β -lactamases in Gram-Negative clinical isolates collected in the United States from 2001-2002. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3318-3324.
90. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain

- (October 1999- December 2000). J Antimicrob Chemother 2001; 48:383-389.
91. Kim J, Lim YM, Rheem I, Lee Y, Lee JC, Seol SY, Lee YC, Cho DT. CTX-M and SHV-12 β -lactamases are the most common extended-spectrum enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* collected from 3 university hospitals within Korea. FEMS Microbiol Lett 2005; 245:93-98.
92. İstanbullu A, Midilli K, Aygün G, Özdamar M, Yanık S, Divanoğlu Y, Atlas K. Hastanemizde izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin plazmid kökenli AmpC beta-laktamaz varlığı yönünden araştırılması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 19-23 Eylül 2004, Aydın, Kongre Kitabı s:263.